

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin
Direktor: Prof. Dr. K.M. Einhäupl

DISSERTATION

Cortical spreading ischaemia als Folge von freiem Hämoglobin und
erhöhter Kaliumkonzentration im Subarachnoidalraum induziert
corticale Infarkte bei der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt Universität zu Berlin

von
Natalie R. Ebert
aus Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl
2. Prof. Dr. med. U. Heinemann
3. Prof. Dr. med. G. Siegel

Meinen Eltern gewidmet

1	Einleitung.....	6
1.1	Die <i>cortical spreading depression</i> nach Leão.....	6
1.1.1	Die Entstehung der <i>cortical spreading depression</i>	6
1.1.2	Die Bedeutung der langsamen Summenpotentiale	8
1.1.3	Die Ionenverteilung während der <i>cortical spreading depression</i>	9
1.1.4	Die Blutflußveränderungen während der <i>cortical spreading depression</i>	10
1.2	Die <i>cortical spreading ischaemia</i>	10
1.2.1	Die Rolle des Stickstoffmonoxid als Vasodilatator	11
1.2.2	Das Hämoglobin als <i>NO-scavenger</i>	12
1.2.3	Der Einfluß der cerebralen Kaliumkonzentration.....	13
1.3	Ischämische Hirninfarkte	14
1.3.1	Formen und Charakteristika der cerebralen Ischämie	14
1.3.2	Formen der Depolarisation bei der Ischämie.....	15
1.3.3	Zeitlicher Verlauf der Zellschäden bei der fokalen cerebralen Ischämie im Tierversuch	16
1.4	Migräne.....	16
1.4.1	Die Migräne-induzierten Infarkte	17
1.5	Subarachnoidale Blutung.....	18
1.5.1	Das Auftreten des <i>delayed ischaemic neurological deficit</i> (DIND)	18
1.6	Problemstellung der Arbeit	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Tiermodell	21
2.2	Versuchsaufbau und Bedingungen	21
2.2.1	Tierpräparation	21
2.2.2	Die kraniale Fensterpräparation	22
2.2.3	Die Zusammensetzung der artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF)	24
2.2.4	Hämoglobinpräparation.....	26
2.2.5	Histologie	26
2.2.6	Immunhistochemie	27
2.2.7	Meßeinrichtung und Verfahren	27
2.3	Versuchsdurchführung	29

3	Ergebnisse.....	31
3.1	Pathophysiologische cerebrale Veränderungen durch das Entstehen der <i>cortical spreading ischaemia</i>	31
3.1.1	Einteilung der Gruppen	31
3.1.2	Versuchsgruppe	31
3.1.3	Kontrollgruppen	33
3.2	Histopathologische cerebrale Veränderungen nach <i>cortical spreading ischaemia</i>.....	35
3.2.1	Versuchsgruppe	36
3.2.2	Kontrollgruppen	41
4	Diskussion	43
4.1	Pathomechanismus der <i>cortical spreading ischaemia</i>: Wirkung und Interaktion von Kaliumionen, NO[•] und Hämoglobin.....	44
4.2	Die Entstehung und der Nachweis von cortikalen Infarkten infolge der <i>cortical spreading ischaemia</i>.....	46
4.3	Der mögliche Zusammenhang von <i>cortical spreading ischaemia</i> und dem <i>delayed ischaemic neurological deficit</i> nach Subarachnoidalblutung	47
4.4	Der mögliche Zusammenhang zwischen den cortikalen Infarkten bei CSI und Migräne-induzierten Infarkten	51
4.5	Ausblick	52
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	55
6.1	Publikationen	68
7	Danksagung	69
8	Erklärung an Eides Statt.....	70

1 Einleitung

1.1 Die *cortical spreading depression* nach Leão

Im Jahre 1941 beschrieb der Neuropsychologe Lashley aus Harvard seine eigene visuelle Migräneaura als ein Flimmern, welches sich vom Zentrum des Sehens aus in ein Gesichtsfeld bewegte. Er interpretierte das Phänomen als eine Welle neuronaler Übererregung, gefolgt von neuronaler Inhibition, die mit 3 mm/min über den visuellen Cortex wandert (Lashley, 1941). Drei Jahre später entdeckte der brasilianische Physiologe Aristides Leão eine Welle neuronaler Übererregung, gefolgt von einer Depression der Aktivität, die sich mit 3 mm/min im Cortex des Kaninchens ausbreitete. Leão nannte seine Entdeckung *cortical spreading depression* (CSD) und beschrieb damit eine sich ausbreitende Depression neuronaler Aktivität in der Hirnrinde. 1945 brachten Leão und Morison dann die Klinik der Migräneaura des Menschen mit der CSD im Tierexperiment in Verbindung und formulierten damit die sogenannte „Spreading Depression“-Theorie der Migräneaura (Leão und Morison, 1945). Mittlerweile sind eine Vielzahl weiterer Erkrankungen mit der CSD in Zusammenhang gebracht worden, zu denen der ischämische Hirninfarkt (Branston et al., 1977; Nedergaard und Astrup, 1986; Strong et al., 1983), das Schädelhirntrauma (Mayevsky et al., 1996; Oka et al., 1977), die Epilepsie (Avoli et al., 1991; Leão, 1944) und die Hypoglykämie (Astrup und Norberg, 1976) gehören.

Im Hirn kommt es als Folge der CSD zu vaskulären und metabolischen Veränderungen. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit dem Einfluß auf den cerebralen Blutfluß. Hierzu wurde im Tierexperiment die Rolle der subarachnoidalen Kalium- und der kortikalen Stickstoffmonoxidkonzentration (NO[•]) eingehend untersucht.

1.1.1 Die Entstehung der *cortical spreading depression*

Die CSD ist bereits in verschiedenen Tiermodellen (u.a. Ratte, Maus, Kaninchen, Hase, Katze, Hund, Affe), in unterschiedlichen Hirnregionen (z.B. Cortex, Hippocampus, Retina) und unter variierenden Anästhesieformen (z.B. Barbiturate, Halothan, Chloralose) ausgelöst worden. Im menschlichen Hirngewebe ist die CSD *in vitro* im Hippocampus (Avoli et al., 1991) und *in vivo* im Striatum (Sramka et al., 1977) sowie im Cortex (Mayevsky et al., 1996)

beobachtet worden.

Die CSD wird im Tierversuch durch chemische, elektrische und mechanische Stimuli ausgelöst und kann als relativ stereotype, pathologische Reaktion des astroglial-neuronalen Netzwerks auf unterschiedliche Noxen angesehen werden (Somjen et al., 1992). Die experimentell am weitesten verbreitete Methode der CSD-Auslösung ist die cortikale Applikation von Kaliumchlorid, wobei die Schwellenkonzentration bei subduraler Kaliumapplikation bei etwa 80 mmol/l (Bures et al., 1974; Dreier et al., 2000) liegt. Bei der intracortikalen Injektion ist eine circa achtmal geringere Konzentration von 10-12 mmol/l ausreichend (Nicholson und Kraig, 1981), während bei der epiduralen Applikation eine wesentlich höhere Konzentration notwendig ist. Als Alternative zur Kaliumapplikation gibt es die Möglichkeit, mit einer dünnen Nadel in die äußerste Schicht des Cortex zu stechen, den sogenannten *pin-prick*. Diese Methode ist recht sicher, hat jedoch den Nachteil, nicht beliebig oft wiederholbar zu sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Implantation von bipolaren Elektroden in den Cortex, die zum Auslösen von CSDs bei Versuchen mit nicht-narkotisierten Tieren durchgeführt wurde (Duckrow, 1993). Weitere Möglichkeiten, eine CSD auszulösen, sind die lokale Glutamatapplikation, die Hemmung der cerebralen $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpen, das Herabsetzen der interstitiellen Chloridkonzentration, das Erzeugen einer Hypoglykämie sowie das lokale Kühlen des Cortex (Bures et al., 1974; Hansen und Lauritzen, 1984; Marshall, 1959).

Für das Auslösen der CSD spielt das Kalium eine entscheidende Rolle. Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration führt zur Depolarisation von präsynaptischen Nervenendigungen, die ausreicht, spannungsabhängige Kationenkanäle zu öffnen. Der folgende Natrium- und Kalzium-Einstrom in die Zelle führt zur Freisetzung exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitter. Freigesetztes Glutamat öffnet subsynaptische rezeptorgebundene Kationenkanäle an Dendriten und führt so zu einer Depolarisation der Zellmembran. Hierbei ist für die Wiedereinstellung des Kaliumgleichgewichts im Extrazellulärraum die Pufferkapazität der Gliazellen von großer Bedeutung (Nicholson und Kraig, 1981; Paulson und Newman, 1987).

Es gibt zur Zeit noch keine ausreichende Erklärung für den wandernden Mechanismus der CSD. Es scheint jedoch, als ob dies mit der Diffusion von Kaliumionen (Grafstein, 1963; Nicholson, 1993; Scheller et al., 1991) und Glutamat (Avoli et al., 1991; Gorelova et al.,

1987; Lauritzen et al., 1988; Lauritzen, 1994) im Extrazellulärraum zusammenhängt. Es ist nachgewiesen worden, daß sich die extrazelluläre Glutamatkonzentration etwa um den Faktor 20 erhöht (Scheller et al., 1991) und über die NMDA-Rezeptoren zur Propagation der CSD beiträgt. Weiterhin gibt es Beobachtungen, die darauf hinweisen, daß Kalziumwellen innerhalb von Gliazellen und Neuronen mit der CSD assoziiert sind (Basarsky et al., 1998; Kunkler und Kraig, 1998; Nedergaard, 1994).

In der menschlichen Hirnrindenarchitektur ist der primäre visuelle Cortex der Bereich mit dem kleinsten Verhältnis zwischen glialen und neuronalen Zellen (Bailey und von Bonin, 1951). Dies wird als Grund dafür angesehen, daß Migräneanfällen am häufigsten im okzipitalen Cortex entstehen.

1.1.2 Die Bedeutung der langsamen Summenpotentiale

In der Literatur wird der Begriff der langsamen Summenpotentiale als *direct current* (DC)-Potential bezeichnet und in der Einheit mVolt angegeben. Im Tierexperiment ist es mit Hilfe einer Silber-Silberchlorid(Ag-AgCl)-Elektrode möglich, Gleichspannungspotentiale am Hirncortex zu messen und an Hand von Spannungsänderungen eine CSD zu identifizieren. Im Verlauf der CSD kommt es zu einem steilen Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration (Hansen et al., 1980; Kraig und Nicholson, 1978). Man geht davon aus, daß der regional begrenzte Anstieg der extrazellulären Kaliumionen die Gliazellmembran depolarisiert und zu einer Potentialdifferenz mit den benachbarten Gliazellen führt. Dadurch entsteht ein Strom, in dessen Folge positiv geladene Kaliumionen aus dem Extrazellulärraum in die Gliazellen am Ort der extrazellulären Kaliumerhöhung einströmen, so daß der Extrazellulärraum dort negativ wird. Weiter entfernt vom Fokus setzen Gliazellen dafür Kaliumionen frei, und der Extrazellulärraum wird dort positiv (Paulson und Newman, 1987). Die langsamen extrazellulären Potentialänderungen können mit der Ag-AgCl-Elektrode gemessen werden.

Das DC-Potential beschreibt während der CSD einen typischen biphasigen Verlauf. Anfangs kommt es zu einer starken negativen Potentialverschiebung (Depolarisation) um 5 bis 30 mV, die sich nach 1-2 Minuten umkehrt (Repolarisation) und in eine kurze schwache Positivierung (Hyperpolarisation) übergeht, bevor es schließlich zur Normalisierung kommt (Bures et al., 1974; Marshall, 1959).

1.1.3 Die Ionenverteilung während der *cortical spreading depression*

Die Depolarisation der Hirnrinde geht mit einer drastischen Veränderung der Ionenverteilung zwischen dem Intra- und dem Extrazellulärraum einher. Dabei unterteilen Hansen und Lauritzen (1984) die Ereignisse in die Phase 1, welche vor der rapiden negativen DC-Potentialverschiebung auftritt, und die Phase 2.

Während der Phase 1, die nur einige Sekunden lang andauert, kommt es vor den schnellen Ionenverschiebungen zu einer initialen Erhöhung der physiologischen extrazellulären Kaliumkonzentration von 3 mmol/l auf etwa 10 mmol/l. Diese Ionenverschiebung geht mit einer Reduktion der spontanen neuronalen Aktivität einher, die auch als *initial silence* bezeichnet wird (Grafstein, 1963). Während der Phase 2 steigt die Kaliumkonzentration zeitgleich mit der raschen negativen DC-Potentialverschiebung innerhalb weniger Sekunden weiter auf 60 mmol/l an. Zur gleichen Zeit gelangt Natrium zusammen mit Kalzium in die Zelle, daraus folgt im Extrazellulärraum ein Abfall der Natriumkonzentration von 130 auf 70 mmol/l und der Kalziumkonzentration von 1,5 auf 0,15 mmol/l. Vermittelt durch transmitterabhängige Ionenkanäle an den postsynaptischen Membranen, kommt es zum Einstrom von Chlorid in die Zelle. Durch den NaCl-Einstrom in die Zelle, dem osmotisch gebundenes Wasser folgt, nimmt das Extrazellulärvolumen auf etwa die Hälfte der Ausgangsgröße ab. Der pH-Wert erfährt initial während der negativen Potentialverschiebung eine charakteristische Alkalisierung, der ein ca. 10minütiger pH-Abfall in den aziden Bereich folgt. Während dieser Zeit ist die Lactatkonzentration im Gehirn deutlich erhöht (Gjedde et al., 1981) und fällt dann mit der pH-Wert-Einstellung wieder auf den Normalwert ab (Mutch und Hansen, 1984). Das Wiedereinstellen der ursprünglichen Ionenkonzentrationen und der Zellraumverhältnisse tritt überwiegend spontan nach 30 bis 60 Sekunden auf. Nur die Kalziumionen und der pH-Wert benötigen einige Minuten um sich zu erholen.

In vielerlei Hinsicht erinnert das gestörte Ionengleichgewicht während der CSD an eine transiente Ischämie, mit dem grundlegenden Unterschied, daß die Energieversorgung der Nervenzellen während einer CSD nicht gestört ist (Hansen und Lauritzen, 1984; Marshall, 1959).

1.1.4 Die Blutflußveränderungen während der *cortical spreading depression*

Die Ionenverschiebungen während der CSD hängen eng mit einer akuten mehrphasigen Veränderung des regionalen cerebralen Blutflusses (rCBF) zusammen. So reagiert der rCBF auf die CSD zunächst variabel mit einer kurzandauernden Blutflußverminderung, gefolgt von einem akuten Anstieg auf das Doppelte bis Dreifache des Ruheflusses. Dieser etwa zweiminütige Blutflußanstieg wird als *cortical spreading hyperaemia* (CSH) bezeichnet (Duckrow, 1991; Hansen et al., 1980; Wahl et al., 1987). Man geht davon aus, daß der akute Blutflußanstieg im Rahmen der CSD zur Wiederherstellung der cerebralen Ionenhomöostase beiträgt, indem er die dafür notwendige Energie liefert. Zusätzlich unterstützt der Blutflußanstieg wahrscheinlich eine Clearance des Extrazellulärraums von toxischen Substanzen. Im Anschluß an die CSH tritt ein langanhaltender milder Blutflußabfall um 20 bis 30% des Ruheblutflusses auf, der auch als *cortical spreading oligoemia* (CSO) bezeichnet wird (Duckrow, 1991; Lauritzen, 1994). Während dieser Phase ist die Autoregulation der cerebralen Perfusion intakt, wohingegen die CO₂-Reaktivität der cerebralen Gefäße um etwa 50% abfällt (Lauritzen, 1984). Ungefähr 90 Minuten nach dem Ablauf der CSD steigt der cortikale Blutfluß wieder auf den Ausgangswert an. Dieses Muster der cortikalen Blutflußveränderung ist in ähnlicher Form auch während des Ablaufs einer Migräneattacke zu beobachten (Hansen und Lauritzen, 1984).

In diesem Zusammenhang werden einige Substanzen als mögliche Mediatoren zwischen dem cerebralen Metabolismus und der Blutflußantwort diskutiert, zu denen Kaliumionen, Protonen, Adenosin und Stickstoffmonoxid gehören (Villringer und Dirnagl, 1995).

1.2 Die *cortical spreading ischaemia*

In Untersuchungen über CSD-abhängige Ionenverschiebungen konnte unlängst nachgewiesen werden, daß interzelluläre Kalziumwellen der CSD-Ausbreitung vorangehen (Kunkler und Kraig, 1998). Da diese Kalziumwellen in einem engen Zusammenhang mit der CSD beobachtet wurden, könnten sie möglicherweise Auslöser für eine Reihe von CSD-abhängigen cortikalen Mechanismen sein. Dazu gehört u.a. die Aktivierung der konstitutiven

NO⁻-Synthase (cNOS), die zu einem Anstieg von NO⁻ führt. Dieser NO⁻-Anstieg geht im Verlauf der CSD typischerweise dem Anstieg des rCBF (CSH) voraus (Read und Parsons, 2000).

Um die Bedeutung von NO⁻ bei der CSD-abhängigen Blutflußantwort zu untersuchen, behandelte Duckrow 1993 seine Versuchstiere mit dem NO⁻-Synthasehemmer N-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) und beobachtete eine Verstärkung der kurzen initialen Hypoperfusion auf die CSD (Duckrow, 1993). Diese initiale Hypoperfusion trat zeitgleich mit dem Beginn der astroglär-neuronalen Depolarisation auf und unterstützte die Annahme, daß NO⁻ an der Regulation des rCBF während der CSD beteiligt ist. Eine deutliche Verstärkung und Verlängerung der kurzen initialen Hypoperfusion konnte erzielt werden, wenn zusätzlich zu der NO⁻-Senkung die subarachnoidale Kaliumkonzentration erhöht wurde (Dreier et al., 1998). Dazu wurden Rattenhirne mit einer artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF) superfundiert, in der die Kaliumkonzentration von physiologischen 3 mmol/l auf 20 mmol/l erhöht und die NO⁻-Konzentration durch den NO⁻-Synthasehemmer N-Nitro-L-Arginin (L-NNA) vermindert wurde. Es kam nach dem Auslösen der CSD zu einem Blutflußabfall in den ischämischen Bereich mit der Folge einer deutlich verzögerten Repolarisation. Dieses Phänomen wurde als *cortical spreading ischaemia* (CSI) bezeichnet. Das dabei gemessene Muster der Produktion freier Sauerstoffradikale entsprach dem einer transienten Ischämie und nicht mehr dem einer regulären CSD (Dreier et al., 1998).

1.2.1 Die Rolle des Stickstoffmonoxid als Vasodilatator

Die Identifikation des *endothelium relaxing factor* (EDRF) als Stickstoffmonoxid (NO⁻), einer hoch beweglichen, kurzlebigen und sehr reaktiven chemischen Verbindung, trug grundlegend zum Verständnis der physiologischen Zellfunktion bei (Furchgott und Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). NO⁻ wird aus der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin durch die NO⁻-Synthase (NOS) gebildet und ist, aufgrund seiner chemischen Eigenschaften, *in vivo* schwer meßbar. In vielen Studien, die sich mit der Wirkung von NO⁻ beschäftigen, behilft man sich daher mit Substanzen, die zur Abnahme der NOS-Aktivität führen. Diese Substanzen hemmen die NOS kompetitiv, indem sie ein falsches L-Arginin-analoges Substrat für die NO⁻-Synthese anbieten. In einer Reihe von Arbeiten war es durch die cerebrale NOS-Hemmung möglich, die Blutflußantwort auf die CSD herabzusetzen und die gefäßregulierende Rolle des NO⁻ im Rahmen der CSD zu zeigen (Colonna et al.,

1994; Duckrow, 1993; Fabricius und Lauritzen, 1994; Goadsby et al., 1992). Dem stehen allerdings Arbeiten von Irikura et al., Wang et al., Wolf et al. und Zhang et al. entgegen, die diese Abnahme der CSD-abhängigen Blutflußantwort durch die Hemmung der cortikalen NOS-Aktivität nicht nachweisen konnten (Irikura et al., 1994; Wang et al., 1992; Wolf et al., 1996; Zhang et al., 1994).

Aus der Vielzahl von NO-Funktionen ist zum Verständnis der hier vorliegenden Arbeit insbesondere die vasodilatatorische Wirkung von Interesse. Sie wird unter anderem darauf zurückgeführt, daß lösliche Guanylat-Cyclase (sGC) aktiviert wird und so zur Bildung von cyclischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) führt (Moro et al., 1996). Durch die Aktivierung einer cGMP-abhängigen Proteinkinase kommt es z.B. zur Öffnung von Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen in Zellen der glatten Muskulatur von Arterien und somit zur Relaxation (Robertson et al., 1993). Das erhöhte cGMP kann experimentell bestimmt und als biochemischer Marker der NO-Aktivität genutzt werden.

Ein weiterer, cGMP-unabhängiger Mechanismus des NO ist bei der Wirkung des cerebralen Glutamats von Bedeutung. Durch eine Herabregulation der NMDA-Rezeptoren scheint NO eine wichtige Rolle als Mediator bei der Glutamat-abhängigen cerebralen Hyperämie zu spielen. Dabei kommt es durch die Reaktion von NO mit Thiolgruppen an der regulierenden Redoxstelle des NMDA-Rezeptors zur Herabregulation der Rezeptoraktivität. Diese Redoxreaktion wird nicht direkt durch endogen entstandenes NO bewirkt, sondern findet unter Bedingungen statt, die eine S-Nitrosylierung (Reaktion bzw. Übertragung von oxidiertem Nitrosium (NO^+)) des NMDA-Rezeptorthiols begünstigen (Lipton et al., 1993; Pelligrino et al., 1996).

1.2.2 Das Hämoglobin als *NO-scavenger*

Die NO-Bindungsaffinität des freien Oxy-Hämoglobins ist strukturabhängig. Zum Verständnis der Rolle des Hämoglobins in dem hier vorliegenden Versuchsmodell sind insbesondere zwei molekulare Gruppen von besonderem Interesse, die Hämgruppe und die reaktive Sulfhydryl-Gruppe. Wird Sauerstoff in der Lunge an die Hämgruppe gebunden, so wird zugleich die NO-Bindung an das Cystein⁹³ der reaktiven Sulfhydryl-Gruppe des Hämoglobins begünstigt. Aus dem Oxy-Hämoglobin wird durch die Bindung von NO an das Cystein⁹³ das S-nitroso-Hämoglobin. In der Blutbahn erfährt das S-nitroso-Hämoglobin

während der Deoxygenierung eine allosterische Umwandlung von der R (oxigenierte)- in die T (deoxygenierte)-Form. Zugleich wird die NO⁻-Gruppe freigesetzt. Dabei wirkt die R-Struktur aufgrund ihrer hohen O₂- und NO⁻-Affinität auf die Blutgefäße verengend, während die T-Struktur durch (die Abgabe von NO⁻ und) ihre geringe O₂- und NO⁻-Affinität eine Gefäßerweiterung hervorruft. Auf diese Weise kann Hämoglobin, abhängig vom physiologischen Sauerstoffgradienten des Gewebes, durch eine Konformationsänderung in der Position des Cystein⁹³ den örtliche Blutfluß mit dem Sauerstoffbedarf des Gewebes in Einklang bringen (Jia et al., 1996; Stamler et al., 1997).

Als weitere Substanz reguliert das erythrozytäre Gluthation zusammen mit anderen kleinmolekularen Thiolen die NO⁻-Freisetzung am Cystein⁹³ des Hämoglobins. Es kann selbst NO⁻ aus dem Erythrozyten an endotheliale Rezeptoren abgeben, was zur Gefäßerweiterung führt. Liegt nun Hämoglobin frei im Extrazellulärraum vor, fehlt die regulierende Wirkung des Gluthations. Dann überwiegt die NO⁻-abfangende Wirkung, und es kommt zu einer hochgradigen Gefäßverengung. Die Affinität des freien Hämoglobins zu NO⁻ ist bis zu 10.000mal höher als zu Sauerstoff (Perutz, 1996). Die Natur nutzt dieses Phänomen bei akuten Blutungen, da durch die gefäßverengende Wirkung des freien Hämoglobins das Risiko einer erneuten Blutung herabgesetzt wird.

1.2.3 Der Einfluß der cerebralen Kaliumkonzentration

Die direkte Wirkung von Kaliumionen auf die cerebrale Zirkulation ist konzentrationsabhängig. McCulloch und Mitarbeiter haben in Arbeiten über die vasomotorische Antwort pialer Venen und Arterien gezeigt, daß es bei der perivaskulären Injektion von einer kaliumfreien ACSF zu einer signifikanten Reduktion des arteriellen pialen Gefäßdurchmessers kommt. Bei einer 10-mM-Kaliumkonzentration kommt es zu einer signifikanten Zunahme des arteriellen pialen Gefäßkalibers und bei einer weiteren Steigerung auf 40 mmol/l zu einer signifikanten Konstriktion der pialen Arterien und Venen (McCulloch et al., 1982). Es gibt eine Reihe weiterer Arbeiten, die diese Kaliumkonzentrationsabhängigkeit des Tonus cerebraler Arterien und Arteriolen belegen (Edwards et al., 1992; Kuschinsky et al., 1972).

Auch über das Zusammenspiel von Kalium und NO⁻ bei der Vasomotorik gibt es eine Reihe von Daten in der Literatur. So entdeckten Rapoport und Murad an der isolierten Aorta von

Ratten einen synergistischen vasodilatierenden Effekt bei mäßiger extrazellulärer Kaliumerhöhung (10 mmol/l) in Kombination mit dem NO-Donor Natriumnitroprussid (Rapoport und Murad, 1983). Im Gegensatz dazu ist an isolierten Arterien von Hunden gezeigt worden, daß eine Abnahme der NO-Aktivität die vasokonstringierende Wirkung der hohen Kaliumkonzentration verstärkt (Minato et al., 1995; Rapoport et al., 1985).

1.3 Ischämische Hirninfarkte

Die Funktionstüchtigkeit des ZNS ist aufgrund seines hohen Energieverbrauchs und der fehlenden Reserven energetischer Substrate in besonderer Weise von einer gesicherten Versorgung mit Sauerstoff und Glukose durch die cerebrale Durchblutung abhängig. Schon innerhalb sehr kurzer Zeit führt eine Unterbrechung der Substratzufuhr durch Mangeldurchblutung (cerebrale Ischämie) anfangs zu reversiblen („funktionellen“), in weiterer Folge zu irreversiblen („strukturellen“) Schäden.

Unterschreitet der Blutfluß im minderperfundierten Hirnareal einen Schwellenwert von 0,55 ml/g/min, kommt es zunächst zur Störung der Proteinsynthese, bei einem weiteren Absinken auf 0,35 ml/g/min tritt eine Stimulation der anaeroben Glykolyse auf, ab 0,20 ml/g/min kommt es zur Freisetzung von Neurotransmittern und zur Beeinträchtigung des Energiemetabolismus, bis dann bei 0,15 ml/g/min schließlich die anoxische Depolarisation auftritt (Hossmann, 1994). Auch die Empfindlichkeit der verschiedenen Hirngewebszellen auf Sauerstoffmangel ist unterschiedlich. Die Nervenzellen reagieren auf eine cerebrale Mangeldurchblutung am sensibelsten, wohingegen die mesenchymalen Gewebsbestandteile und die Mikroglia am widerstandsfähigsten sind. Die Astrozyten gelten ebenfalls als relativ robust. Bezüglich der Oligodendroglia sind die Angaben widersprüchlich.

1.3.1 Formen und Charakteristika der cerebralen Ischämie

Es existieren prinzipiell zwei Formen der cerebralen Ischämie, die globale und die fokale cerebrale Ischämie. Diese beiden Formen unterscheiden sich in der Pathophysiologie, Symptomatologie und Therapie.

Zur globalen cerebralen Ischämie kann es infolge eines vorübergehenden Herzkreislaufstillstandes kommen. Dabei treten irreversible Schäden meist schon wenige Minuten nach kompletter Blutflußunterbrechung auf. Nach mehr als 10 Minuten kommt es in der Regel zum Hirntod. Untersucht man Hirne nach einer tödlich verlaufenden globalen Ischämie, mit Verzögerung von Tagen bis Wochen, zeigt sich ein charakteristisches Schadensbild: geschrumpftes Zytoplasma mit intakten Organellen und aufrechterhaltener Membranintegrität, Chromatinkondensation, Zellkernfragmentierung sowie abgeschnürte Zellkörperchen. Diese histologischen Merkmale sprechen für das Auftreten einer Apoptose („programmierter Zelltod“) (Bredesen, 1995).

Im Gegensatz dazu spricht man von einer fokalen cerebralen Ischämie, wenn es zur reversiblen oder permanenten Durchblutungsstörung eines bestimmten Hirnareals kommt. Der Verschuß oder die hochgradige Verengung einer Hirnarterie, die funktionell einer Endarterie entspricht, führt zur Entstehung eines ischämischen Hirninfarktes. Während im Kern der Ischämie die kritische Perfusionsschwelle sicher unterschritten ist, kommt es in der Peripherie mit zunehmendem Abstand durch die Versorgung von Kollateralgefäßen zur verbesserten Blutzufuhr. In dieser, als Penumbra bezeichneten Randzone ist der Funktionsstoffwechsel infolge abgesunkener Perfusion zwar gestört, irreversible strukturelle Schäden treten jedoch zunächst nicht auf (Back et al., 1998; Dirnagl und Meisel, 1999). Histologisch zeigt sich ein nekrotischer Zelluntergang mit dem Verlust von Zellgrenzen und der für die Zellfunktion notwendigen Organellen. Ein verzögerter Zelltod mit Anzeichen von Apoptose findet sich bei der fokalen cerebralen Ischämie im Gegensatz zur globalen cerebralen Ischämie lediglich im Bereich der Penumbrazone (Li et al., 1995).

1.3.2 Formen der Depolarisation bei der Ischämie

Im Rahmen einer fokalen Ischämie resultiert kurze Zeit nach der kritischen Reduktion der Blutzufuhr zum Gehirn das Erliegen der ATP-abhängigen Ionenpumpen. Zunächst kommt es zur Öffnung von Kaliumkanälen in Neuronen, so daß positiv geladene Kaliumionen aus dem Zellinneren ausströmen. Als Folge hyperpolarisieren die Nervenzellen und verlieren ihre physiologische Funktion im Zellverband. Durch die extrazelluläre Kaliumerhöhung werden die Astrogliazellen gleichzeitig depolarisiert. Bleibt der Energiemangel bestehen, schlägt die Hyperpolarisation der Nervenzellen im Verlauf von 1-2 Minuten in eine Depolarisation um, die wahrscheinlich ebenfalls durch die Öffnung von Ionenkanälen vermittelt wird

(Müller und Somjen, 1998). Dies bedingt im Zentrum der Ischämie die sogenannte anoxische Depolarisation der Zellen. Der Substratmangel bedingt auch, daß die energieabhängige präsynaptische und astrozytäre Wiederaufnahme von exzitatorischen Aminosäuren, allen voran Glutamat, gestört wird. Es kommt zur Diffusion von Kalium und Glutamat in die Penumbrazone, was zur weiteren exzitatorischen bzw. elektrochemischen Depolarisation von Neuronen und Gliazellen führt. Auf diese Weise kommt es auch in der Penumbrazone zu Depolarisationen, die aber im Gegensatz zur anoxischen Depolarisation nicht persistierend sind. Diese Depolarisationen werden als Periinfarktdepolarisationen bezeichnet (Back et al., 1998; Dirnagl und Meisel, 1999; Nedergaard und Hansen, 1988) .

1.3.3 Zeitlicher Verlauf der Zellschäden bei der fokalen cerebralen Ischämie im Tierversuch

Die Zellveränderungen nach fokaler cerebraler Ischämie können im Tierversuch abhängig vom zeitlichen Verlauf in unterschiedliche Phasen eingeteilt werden. Dabei treten akute Zellschäden (Zellschrumpfung oder Zellschwellung) schon innerhalb der ersten sechs Stunden auf. Zur gleichen Zeit beginnt auch die Akkumulation von Leukozyten in der cerebralen Mikrozirkulation bzw. deren Extravasation in das betroffene Hirnparenchym. Sechs bis zwölf Stunden nach Okklusion beginnt die Kernpyknose mit Zytoplasmaeosinophilie von Nervenzellen (sogenannte *red neurons*). Später entwickeln sich daraus Zellen mit dem Verlust der Hämatoxilinophilie (sogenannte *ghost neurons*). Bei kompletter Okklusion der versorgenden Arterie zeigt sich nach 72 bis 96 Stunden das charakteristische histologische Bild eines Hirninfarkts mit Pannekrose von Neuronen, Gliazellen und Blutgefäßen (Garcia et al., 1995).

1.4 Migräne

Als Migräne wird eine attackenförmige Kopfschmerzkrankung bezeichnet, die meist halbseitig auftritt und mit anderen neurologischen Symptomen und Übelkeit, Erbrechen sowie Photophobie einhergehen kann. Die Prävalenz der Migräne liegt laut einer aktuellen epidemiologischen Kohortenstudie (6491 eingeschlossene Patienten) bei 33% (Frauen) bzw. 13,3% (Männer) (Launer et al., 1999). Geringere Prävalenzangaben sind in älteren Studien zu

finden, die zwischen 22,7 und 24 % bei der Frau sowie 12 und 12,4% beim Mann liegen (Russell et al., 1995; Tzourio et al., 1995). Bei etwa 10% der Patienten kündigt sich die Migräne durch das Auftreten einer Aura an. Diese Aura bezeichnet fokale neurologische Defizite, die sich als homonyme Sehstörung, halbseitig aufsteigende Kribbelparaesthesie sowie transiente Sprachstörung äußern können. Die Zusammenhänge der Migräneaura mit der CSD sind bereits im Absatz 1.1 dieses Kapitels beschrieben worden.

Für die Entstehung der Kopfschmerzen machen Moskowitz und Mitarbeiter in Arbeiten über die Migräne-assoziierten cerebralen Blutflußveränderungen einen pathologischen trigemino-vaskulären Effekt verantwortlich. Sie konnten zeigen, daß eine Vielzahl von elektrochemischen und mechanischen Faktoren (z.B. CSD) nozizeptive Substanzen freisetzen, die trigemino-vaskuläre sensorische Fasern stimulieren. Dabei werden vasoaktive Neuropeptide (u.a. Tachykinin, Transmittersubstanz P, Neurokinin A, Calcitonin-gene-related-peptide) aus den perivaskulären Nervenendigungen dieser marklosen C-Fasern ausgeschüttet. Es kommt zur Vasodilatation, Extravasation von Plasmaproteinen und Degranulation von Mastzellen, zusammengefaßt auch als „neurogene Inflammation“ bezeichnet. Eine Ortho- und antidrome Weiterleitung von nozizeptiven Informationen zu trigeminalen Kernen und höheren Hirnzentren führt letztlich zur Wahrnehmung von Schmerzen. Mittels Agonisierung der Serotoninrezeptoren 5-HT_{1b} bzw. 5-HT_{1d} durch Sumatriptan kann die Neuropeptidausschüttung herabgesetzt und die zentrale Schmerzvermittlung blockiert werden (Moskowitz und Macfarlane, 1993).

1.4.1 Die Migräne-induzierten Infarkte

Angaben darüber, daß die vorübergehenden neurologischen Symptome einer Migräneattacke über lange Zeit persistieren können, gehen bereits auf das 19. Jahrhundert zurück; so hat Féré im Jahre 1881 Fallbeispiele von Migränepatienten veröffentlicht, bei denen permanente neurologische Defizite im Zusammenhang mit Migräneattacken auftraten (Féré, 1881; zitiert nach Broderick und Swanson, 1987).

Sämtliche bevölkerungs- und krankenhausgestützten epidemiologischen Studien haben gezeigt, daß Migränepatienten ein erhöhtes Risiko aufweisen, einen ischämischen Schlaganfall zu erleiden (Buring et al., 1995; Carolei et al., 1996; Merikangas et al., 1997; Tzourio et al., 1995). Das Risiko ist für Migränepatienten mit Aura signifikant höher als für

diejenigen ohne Aura (Carolei et al., 1996; Tzourio et al., 1995). Die Diagnose von Migräne-induzierten Infarkten stützt sich auf bestimmte vorgegebene Kriterien, die vom Headache Classification Committee 1988 festgelegt wurden.

Für das Entstehen dieser Infarktereignisse wird ein enger Zusammenhang mit dem pathophysiologischen Korrelat der Migräneaura, der CSD, angenommen, da Hinweise auf primär kardiale oder arterielle Läsionen nicht gefunden wurden. Nach einer Reihe von klinischen Untersuchungen gehen Bogousslavsky und Mitarbeiter daher eher von einer neuronalen Depression als dem primären verantwortlichen Mechanismus für den Abfall der regionalen Hirndurchblutung aus und vermuten, daß daraus in einigen Fällen eine ischämische Nekrose resultieren könnte (Bogousslavsky et al., 1988). In der vorliegenden Studie wird zum ersten Mal experimentelle Evidenz für die Existenz eines solchen Mechanismus erbracht.

1.5 Subarachnoidale Blutung

Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist eine Blutung in den Liquorraum zwischen Arachnoidea und Pia, die in den überwiegenden Fällen durch die spontane Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas entsteht. Das Risiko, eine SAB zu erleiden, steigt mit dem Alter, wobei jedoch der Anteil jüngerer Patienten mit SAB im Verhältnis zu Patienten mit „Schlaganfällen“ anderer Ätiologie überproportional hoch ist. Den Verlauf der SAB überschattet die relativ hohe Letalität von über 25%. Dies liegt im wesentlichen am Auftreten von verzögerten ischämischen neurologischen Ausfällen, dem sogenannten *delayed ischaemic neurological deficit* (DIND) und an Nachblutungen in Zeiträumen, in denen ein operatives Einschreiten noch nicht möglich ist (Kassell et al., 1990).

1.5.1 Das Auftreten des *delayed ischaemic neurological deficit* (DIND)

Die häufigste Komplikation nach spontaner SAB ist der symptomatische cerebrale Vasospasmus, der durch lokale oder diffuse Gefäßkonstriktion verursacht wird. Die vasospastischen Veränderungen in den größeren Gefäßen können angiographisch dargestellt

werden. Verzögerte ischämische Defizite können bereits um den vierten Tag nach Eintreten der SAB auftreten. Ihr maximales Auftreten wird um den siebten Tag nach SAB erreicht. Generell können sie noch bis zum Tag 14 beobachtet werden. Die Häufigkeit des DIND korreliert direkt mit der Größe des subarachnoidalen Blutgerinnsels und der Menge des computertomographisch nachgewiesenen Blutes in den basalen Zisternen (Fisher et al., 1980). Die Angaben über die Auftretshäufigkeit des DIND schwanken zwischen 4% (Proust et al., 1995) und etwa 40% (Haley et al., 1995). Bei 6% der SAB-Patienten führt das DIND zu bleibenden schweren Behinderungen und bei 7% zum Tod (Kassell et al., 1990). Als histopathologisches Korrelat sind am Hirn weitverteilte glockenförmige und laminäre kortikale Mikroinfarkte nachweisbar (Neil-Dwyer et al., 1994; Stoltenburg-Didinger und Schwarz, 1987). Es wird angenommen, daß der Vasospasmus ein multifaktorielles Ereignis ist, dessen Entstehung mit Hämolyseprodukten, allen voran Oxyhämoglobin, und der Freisetzung vasoaktiver Substanzen, wie Serotonin, Endothelin, Prostaglandin und Katecholamin zusammenhängt (Macdonald, 1997; Zabramski, 1997).

Zur Verbesserung des Outcomes nach SAB durch bessere Behandelbarkeit des DIND und zur Verhinderung von Reblutungen hat die Einführung der Frühoperation des zugrundeliegenden Aneurysmas innerhalb von 72 Stunden beigetragen (Kassell et al., 1990). Die prophylaktische Therapie mit Kalziumantagonisten, insbesondere Nimodipin, hat zu einer Abnahme der Frequenz und Schwere des DIND und damit zu einer Verbesserung der Prognose nach SAB geführt (Feigin et al., 1998). Im Zusammenhang mit der Frühoperation besteht die Möglichkeit, intraoperativ eine intrazysternale Gabe von rekombiniertem Gewebe-Plasminogen-Aktivator (rtPA) zu verabreichen. Dieses Vorgehen ist allerdings umstritten; es konnte in einer randomisierten Multizenterstudie keine statistisch signifikanten Ergebnisse zeigen, sondern lediglich einen positiven Trend zugunsten des rtPA (Findlay et al., 1995). Die Anwendung des Nichtglukokortikoids Tirilazad, welches als potenter Inhibitor der Sauerstoffradikal-Lipidoxidation entwickelt wurde, wird von den klinischen Studien nicht gestützt (Haley et al., 1995; Haley et al., 1997).

Die Therapie des DIND besteht derzeit lediglich in der sogenannten hyperdynamen HHH (hyperton-hypervolämisch-hämodilutierend)-Therapie sowie der Angioplastie, die jedoch nur an spezialisierten Zentren eingesetzt und erprobt wird. Ob allerdings die hyperdynamen Therapie einer Normovolämie überlegen ist, wird kontrovers gesehen (Lennihan et al., 2000).

1.6 Problemstellung der Arbeit

In tierexperimentellen Studien (Dreier et al., 1998) ist durch die Steigerung der extrazellulären subarachnoidalen Kaliumkonzentration, gemeinsam mit einer Konzentrationsminderung von cerebralem Stickstoffmonoxid (NO[•]) durch den NO[•]-Synthasehemmer N-Nitro-L-Arginin (L-NNA), die Rolle von NO[•] und Kalium bei der Blutflußantwort auf die *cortical spreading depression* (CSD) untersucht worden. In diesen Experimenten wurde eine steil abfallende langandauernde Hypoperfusion als Antwort auf die neuronale Depolarisation beobachtet, die als *cortical spreading ischaemia* (CSI) bezeichnet wurde.

Eine physiologisch im Körper vorkommende Substanz mit einer hohen Bindungsaffinität zu NO[•] ist das freie Oxy-Hämoglobin. Dies aufgreifend, beschäftigt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Frage, ob Hämoglobin als *NO-scavenger* in Kombination mit einer erhöhten subarachnoidalen Kaliumkonzentration im Hirn der Ratte auch zu einer CSI führt.

Im Anschluß an die Experimente wurden die Hirne der Versuchstiere durch eine kardiovaskuläre Perfusion mit Fixationslösung konserviert und histologisch aufgearbeitet sowie anhand der festgelegten histopathologischen Kriterien für neuronale Zellschäden beurteilt.

Folglich beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit damit, ob es infolge von CSIs, die durch Hämoglobin und erhöhte Kaliumkonzentration im Subarachnoidalraum provoziert wurden, zu histologisch nachweisbaren Hirninfarkten kommt. Wenn dies der Fall ist, sollte nachgewiesen werden, ob ein maßgeblicher Unterschied zwischen dem Infarktmuster und der Lokalisation nach CSI im Vergleich zu postembolisch bzw. postthrombotisch entstandenen Hirninfarkten besteht.

Eine mögliche klinische Bedeutung der CSI wird im Zusammenhang mit dem *delayed ischaemic neurological deficit* (DIND) nach Subarachnoidalblutung (SAB) diskutiert, da es nach der Lyse subarachnoidaler Erythrozyten zur Akkumulation von freiem Hämoglobin und hohen Konzentrationen von Kaliumionen kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Grundlage der hier vorgestellten Versuche ist ein Modell zur Messung des regionalen cerebralen Blutflusses (rCBF) und des *direct current* (DC)-Potentials am Hirn der narkotisierten Ratte. Durch die Präparation eines kranialen Fensters (s.u.) im Bereich der parietalen Schädelkalotte Halothan-narkotisierter Ratten wurde ein künstlicher geschlossener subarachnoidaler Raum geschaffen, der mit einer artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF) perfundiert wurde. Da die Dura mater entfernt war, kam die Hirnoberfläche in direkten Kontakt mit der ACSF. Nach Beendigung der Fensterpräparation wurde die Narkose ausgeleitet, und die Tiere über einen Zeitraum von zwei Tagen beobachtet. Am dritten Tag wurden die Versuchstiere mit Thiopental narkotisiert und die Schlauchsysteme des kranialen Fensters wieder mit dem ACSF-Perfusor verbunden. Hierbei variierte je nach Gruppe bzw. Fragestellung die Zusammensetzung der ACSF. Dadurch kam es zu unterschiedlichen Blutfluß- und DC-Potentialantworten, die mittels einer Laser-Doppler-Sonde und eines DC-Wandlers gemessen wurden. Nach Beendigung der Messung erwachten die Versuchstiere ein weiteres Mal aus der Narkose und wurden neurologisch untersucht. 24 und 48 Stunden später wurden die Versuchstiere durch eine kardiovaskuläre Perfusion mit Fixationslösung unter Narkose getötet sowie dekapitiert. Die fixierten Hirne wurden am folgenden Tag zur histologischen Beurteilung des cerebralen Gewebsschadens aufgearbeitet, geschnitten und histochemisch eingefärbt.

2.2 Versuchsaufbau und Bedingungen

2.2.1 Tierpräparation

Die Experimente (n=24) wurden an männlichen Wistar-Ratten (Charles River Deutschland, Sulzfeld) mit einem Gewicht von 250 bis 300 g durchgeführt.

Die Narkose der Tiere erfolgte mit Halothan (1,5% in 30% O₂ und 70% N₂O). Die Schwanzarterie wurde mit einem Polyäthylenschlauch (PE 50) kanüliert und zur kontinuierlichen Blutdruckmessung mit einem Druckwandler (RFT Biomonitor, Deutschland) verbunden. Das Gefäß wurde während der gesamten Versuchszeit mit physiologischer Kochsalzlösung gespült (1 ml/h). Durch das Testen der Reaktion der Tiere auf Schmerzreize erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Narkostiefe.

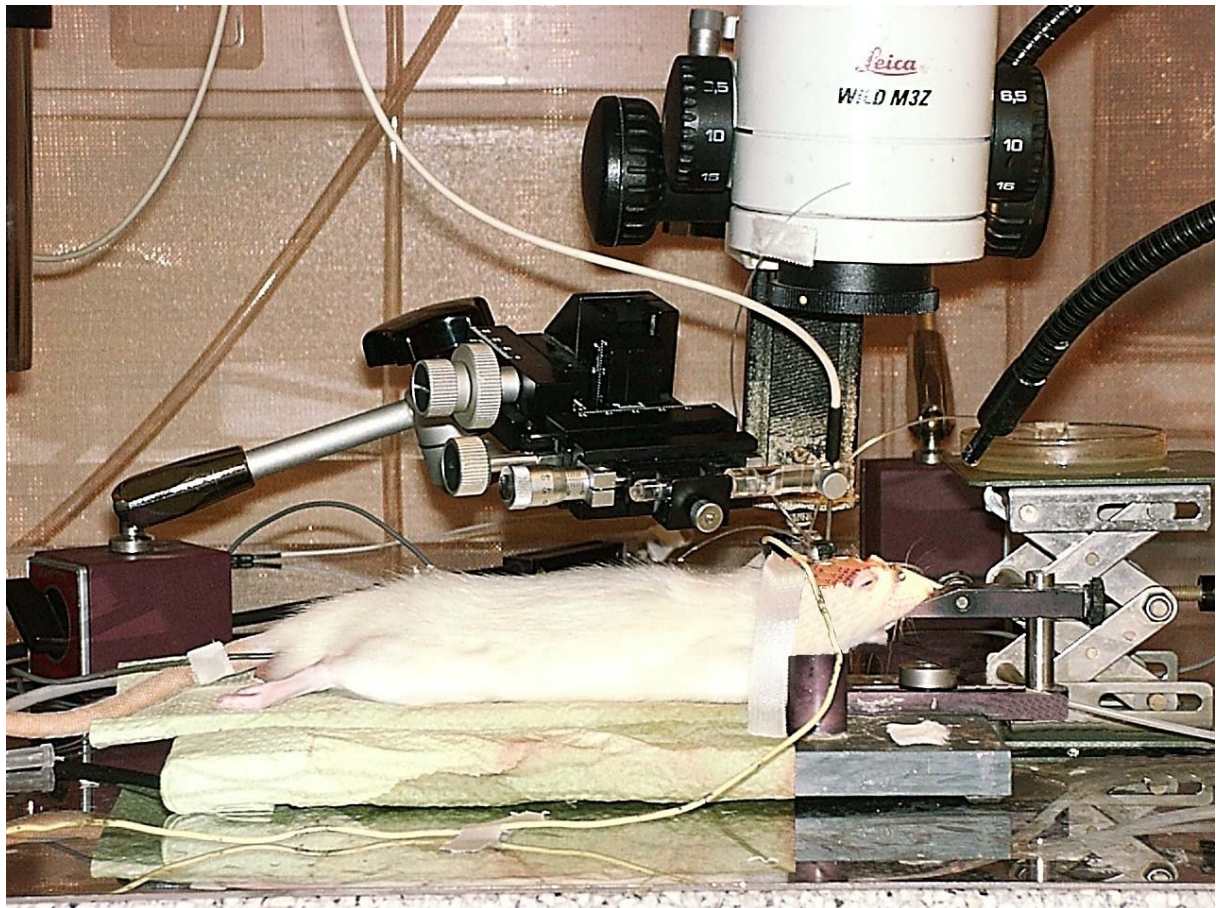


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit dem Tier, dem Mikroskop, und der positionierten Laser-Doppler-Sonde

2.2.2 Die kraniale Fensterpräparation

Die Tiere wurden in einem Schnauzenhalter unter Halothannarkose fixiert. Die Schädelkalotte wurde zur Lokalanästhesie mit 1%iger Xylocainlösung unterspritzt und über beiden Parietalknochen bis zur Okzipitalschuppe freipräpariert. Anschließend wurde eine

Kraniotomie von ca. 2 x 3 mm über der rechten Hemisphäre am Parietalknochen durchgeführt. Die Wand des Fensters wurde aus einem Knochenwachswall geformt. Um das geschlossene Fenster mit der ACSF spülen zu können, wurden zwei Polyäthylenschläuche (PE 50) in dem kaudalen Teil des Knochenwachswalls fixiert. Zur Messung des DC-Potentials wurde ein Ag-AgCl-Draht mit einer Agarbrücke zwischen den beiden Polyäthylenschläuchen im Knochenwachswall befestigt. Um zu verhindern, daß durch eine Blutung aus den meningealen Gefäßen Erythrozyten in den subduralen Raum gelangen, wurden Äste der Arteria meningea media mit einem elektrisch betriebenen Glühdraht koaguliert. Nach dem Ausstreichen der Blutreste wurde die Dura mater im Bereich des Knochenfensters inzidiert und entfernt. Der Raum unterhalb des Fensters und die zuführenden Schläuche wurden mit ACSF gespült. Kurz vor der Superfusion wurde die ACSF mit einem Gasgemisch von 6,6% O₂, 5,9% CO₂ und 87,5% N₂ equilibriert, so daß ein pO₂ von 118,3 ± 14,2 mmHg, ein pCO₂ von 34,0 ± 3,9 mmHg und ein pH-Wert von 7,37 ± 0,09 erreicht wurden. Als letztes wurde ein Deckglas auf den Wachswall gedrückt und mit Zyanoacrylkleber und Paladur®-Acrylmasse abgedichtet.

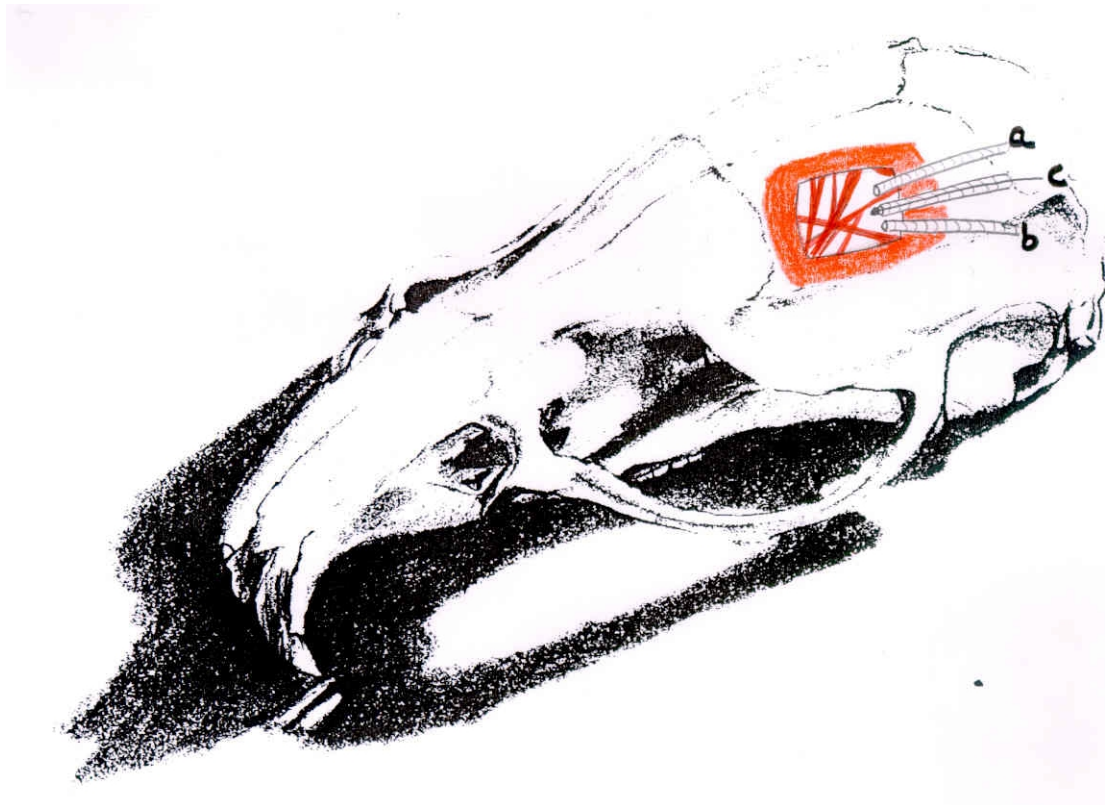


Abbildung 2A : Schematischer Aufbau des kranialen Fensters mit In- und Outflow sowie Ag-AgCl-Elektrode auf dem parietalen Rattenschädel: a Inflow, b Outflow, c Ag-AgCl-Elektrode (Zeichnung modifiziert nach Heike Spranger).



Abbildung 2B: Makroskopische Vergrößerung (5 fach) mit Blick auf die Duragefäße.

2.2.3 Die Zusammensetzung der artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF)

Die physiologische ACSF setzte sich aus den folgenden Bestandteilen (Angabe in mmol/l) zusammen: Na^+ : 152; K^+ : 3; Ca^{2+} : 1,5; Mg^{2+} : 1,2; HCO_3^- : 24,5; Cl^- : 135; Glukose: 3,7; Harnstoff: 6,7. Allerdings unterschieden sich die einzelnen Gruppen in der Zusammensetzung der ACSF voneinander, wobei zum einen die Kaliumkonzentration variiert und zum anderen freies Hämoglobin zugefügt wurde (s. *Tabelle 1*).

Tabelle 1: Die Hämoglobin- und Kaliumkonzentration in der artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF) in den Gruppen I-III.

GRUPPE	I	II	III
Hämoglobin-Konzentration in mmol/l	2	2	0
Kalium-Konzentration in mmol/l	35	3	35/50/80

Bei allen Gruppen wurde damit begonnen, das Hirn mit physiologischer ACSF zu superfundieren.

In der **Versuchsgruppe I** wurde damit fortgefahren, eine ACSF mit 2 mmol/l Hämoglobin und erhöhter Kalium-Konzentration von 35 mmol/l zu superfundieren.

In der **Kontrollgruppe II** wurde eine ACSF mit 2 mmol/l Hämoglobin und 3 mmol/l Kalium superfundiert.

In **Kontrollgruppe III** wurde eine ACSF ohne Hämoglobin und mit einer aufsteigenden Kalium-Konzentration von 35, 50 und 80 mmol/l superfundiert.

Nach 3 Stunden wurde bei allen Experimenten mit einer physiologischen ACSF ausgewaschen.

An die Kaliumkonzentration (3, 35, 50 und 80 mmol/l/l) in der ACSF wurde entsprechend die Natriumkonzentration (152, 120, 105 und 75 mmol/l) angepaßt, um die Osmolarität konstant zu halten.

2.2.4 Hämoglobinpräparation

Das Hämoglobin wurde frisch aus dem heparinisierten arteriellen Blut von Wistar-Ratten präpariert. Das Blut wurde zentrifugiert (2500 g, 5 Minuten, 4°C) und das Plasma abgeschüttet. Die verbliebenen Zellen wurden fünfmal mit dem drei- bis vierfachen Volumen kalter isotoner Kochsalzlösung gewaschen und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend mit Ultraschall lysiert. Die Lösung aus dem lysiertem Zellmaterial wurde nochmals zentrifugiert (15.000 g, 10 Minuten, 4°C) und das Zellpellet entfernt. Der das Hämoglobin enthaltende Überstand wurde durch Gelchromatographie (Bio-Gel P-6, Bio Rad) in die ACSF übertragen. Konzentration und Zusammensetzung des Hämoglobins wurden durch ein Radiometer gemessen (ABL system 625) (gesamt Hb: $2,0 \pm 0,3$ mmol/l; Oxy-Hb: $95,2 \pm 1,9\%$; CO-Hb: $2,3 \pm 1,3\%$; Met-Hb: $2,5 \pm 2,0\%$; Deoxy-Hb: $0,0\%$; O₂-Sättigung: 100%).

2.2.5 Histologie

Die Fixierung der Hirne erfolgte durch kardiovaskuläre Perfusion der narkotisierten Tiere mit einer modifizierten Lillie-Fixierlösung (AFA: absoluter Alkohol (70%), 37%iges Formalin (20%) und Eisessigsäure (10%)). Die Rattenschädel wurden nach der kardiovaskulären Perfusion in die Fixationslösung eingelegt und über Nacht gekühlt. Am folgenden Tag wurden die Rattenhirne aus dem Schädel herauspräpariert und einen weiteren Tag in 96%igem Alkohol eingelegt, bevor sie in Paraffin eingebettet wurden. 8 bis 10 µm dicke sagitale oder koronare Hirnschnitte wurden auf albuminbeschichtete Deckgläschen aufgetragen und entweder mit Hämatoxylin-Eosin oder Kresylviolett-(Nissl) gefärbt (Victorov et al., 2000). Die koronare Schnittführung begann mit einem Abstand von 2 cm von der Fensterregion, die sagitale Schnittführung wurde durch die gesamte Hemisphäre hindurchgelegt. Für die unmittelbar aneinandergrenzenden Schnitte sind die entsprechend unterschiedlichen histochemischen Färbemethoden angewandt worden.

Die lichtmikroskopische Beurteilung von Neuronennekrosen erfolgte nach den Kriterien von Garcia et al. (1995). Sogenannte *red neurons*, die typischerweise in einem Zeitfenster von 24 bis 48 Stunden beschrieben wurden, sind durch das Auftreten von Pyknose und Eosinophilie charakterisiert worden. Die lichtmikroskopischen Kriterien für Apoptose orientierten sich an

den Arbeiten von Li et al. (1995) und Brederesen (1995).

2.2.6 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung diente der genauen Darstellung von Astrozytenzellaktivierung bzw. -nekrose. Sie wurde dem Protokoll von Priller (Priller et al., 1995) entsprechend durchgeführt. Dem Gewebe wurde kurz nach der Deparaffinisierung ein primärer Antikörper (*anti-gliai fibrillary acid protein*-(GFAP) (DAKO, Carpinteria, CA, USA)) über Nacht zugefügt. Danach wurde ein sekundärer, mit Biotin markierter Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugefügt. Zur Erkennung der spezifisch aktivierten Astrozyten (Anti-GFAP-Antikörper) wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode verwendet.

2.2.7 Meßeinrichtung und Verfahren

2.2.7.1 Die Vitalparameter

Die Überwachung der Beatmungsparameter erfolgte während der Fensterpräparation durch die Entnahme von arteriellen Blutproben aus der Schwanzarterie und deren Analyse (paO₂, pH, paCO₂) mit einem Compact 1 Blutgasanalysator (AVL Medizintechnik GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Der systemische arterielle Blutdruck wurde über einen RFT Biomonitor (VEB Meßgerätewerk, Zwickau, Deutschland) registriert. Mit einer rektalen Temperatursonde wurde die Körpertemperatur im Verlauf des gesamten Versuchs gemessen und durch ein geregeltes Heizkissen bei $38,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten.

2.2.7.2 Die Laser-Doppler-Blutflußmethode

Während des Experiments wurde der rCBF in der kapillären Mikrozirkulation kontinuierlich mit einer Laser-Doppler-Sonde (Perimed AB, Järfälla, Schweden) aufgezeichnet. Die Diodenlaser-Sonde wurde auf dem Deckgläschen des geschlossenen Fensters positioniert. Das Prinzip der Laser-Doppler-Blutflußmethode beruht darauf, daß nahinfrarotes Licht von einer Diodenlasersonde (Wellenlänge von 780 nm, Intensität von 1,6 mW) über einen Glaslichtleiter (\varnothing 25 μm) an ein bestimmtes Hirngewebsareal (ca. 1 mm³) ausgesandt und das zurückgeworfene Licht ebenfalls durch einen Glaslichtleiter (\varnothing 25 μm) wieder erfaßt wird. Trifft der Lichtstrahl auf sich bewegendes Medium, so kann auf Grund der

Frequenzverschiebung des zurückgeworfenen Lichts („Optischer Doppler-Effekt“) die Geschwindigkeit der roten Blutzellen, die sich proportional zur Frequenzverschiebung verhält, ermittelt werden. Das Hirngewebe und alle sich nicht bewegenden Teilchen reflektieren das Licht unverändert. Ebenso kann mit dieser Methode das Blutvolumen ermittelt werden. Der zurückgeworfene Anteil des Lichtstrahls verhält sich hierbei proportional zum gesamten Volumen der sich bewegenden Blutzellen im entsprechenden Gewebsareal. Ein Index der Flußgeschwindigkeit der roten Blutzellen leitet sich aus der Multiplikation der mittleren Dopplerverschiebung mit dem zurückgeworfenen Anteil des Lichtstrahls her.

Diese Methode wurde 1989 von Dirnagl und Kollegen (Dirnagl et al., 1989) validiert. Die ermittelten Blutflußwerte sind jedoch keine absoluten Flußwerte, sondern stellen relative Werte dar, die als Anstieg bzw. Abfall des rCBF aufgezeichnet werden. Die so ermittelten rCBF-Veränderungen wurden prozentual zum Ausgangswert am Beginn des Experiments (100%) in Beziehung gesetzt. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß Störfaktoren (z.B. große Gefäße in der Umgebung) möglichst klein gehalten wurden und die Sonde optimal positioniert wurde.

Um den Blutflußabfall während einer CSI an zwei unterschiedlichen Stellen des Cortex zu messen, wurden bei einigen Tieren zwei Laserelektroden an verschiedenen Stellen des kranialen Fensters positioniert. Dies hatte auch den Effekt, daß der über den Cortex wandernde Charakter der CSI dargestellt werden konnte (siehe Abb. 4).

2.2.7.3 Die DC-Potentialmessung

Das DC-Potential wurde im geschlossenen kranialen Fenster mittels eines Ag-AgCl-Drahts mit einer Agar-Brücke gemessen. Die Sonde wurde knapp oberhalb der Hirnoberfläche positioniert und mit einer Kalomelelektrode (FD 223, WPI, Sarasota, FL, USA) sowie einem Verstärker (Jens Meyer, München, Deutschland) verbunden. Auch hierbei wurde darauf geachtet, möglichst konstante Ausgangswerte zu erlangen, um das Ausmaß der Spannungsänderungen, die als absolute Werte angegeben wurden, möglichst exakt zu erfassen. So war es möglich, die entsprechenden Werte einheitlich zwischen den unterschiedlichen Gruppen zu vergleichen.

Die Daten über rCBF, DC-Potential und Vitalparameter wurden kontinuierlich über ein PC-System mit dem Prozeßdatenerfassungsprogramm ASYST (Macmillan Software, New York, USA) und einem Tabellen-Speicher (DASH IV, Astro-Med, Inc, West Warewick, RI, USA) aufgezeichnet.

2.3 Versuchsdurchführung

Im Laufe des Versuchs kam eine Kombination verschiedener Untersuchungsschritte zur Anwendung.

Zu Beginn wurde eine kraniale Fensterpräparation unter Halothannarkose durchgeführt. Der Hirncortex unter dem kranialen Fenster wurde kontinuierlich mit ACSF perfundiert. Danach wurde die Kopfwunde der Tiere mit einem Lidocain-Hydrocain Gel (2%, Astra GmbH, Wedel, Deutschland) behandelt und genäht. Nach dem Diskonnektieren der Perfusionsspritze vom Schlauchsystem des kranialen Fensters wurde abgewartet bis die Tiere erwachten. Unter postoperativer Buprenorphin-Analgesie (0,5 mg/kg BW s.c., Boehringer, Mannheim, Deutschland) wurden die Tiere zwei Tage beobachtet. Schon nach kurzer Zeit erholten sie sich, tranken kräftig und putzten sich.

Am dritten postoperativen Tag wurde der Versuch unter Thiopentalnarkose i.p. (100 mg/kg Körpergewicht, Trapanal®, BYK Pharmaceuticals, Konstanz, Deutschland) weitergeführt.

Unter normalen Bedingungen reichte eine einmalige Injektion von Trapanal® aus, um die Tiere für die gesamte Dauer des Experiments zu narkotisieren. Die Tiefe der Narkose wurde durch häufige Prüfung der Reaktion auf Schmerzreiz überwacht, und es wurde gegebenenfalls Trapanal® nachinjiziert. Eine künstliche Beatmung war nicht notwendig. Um den postoperativen Schmerz und die Analgesiedosis möglichst klein zu halten, wurde auf invasive Eingriffe wie Tracheotomie, Kanülierung der Femoralarterie bzw. -vene und Fixierung im stereotaktischen Rahmen verzichtet.

Nach dem Einsetzen der Narkose wurde das Schlauchsystem des geschlossenen kranialen Fensters erneut an die Perfusionsspritze für die Superfusion der ACSF angeschlossen.

Über einen Zeitraum von 3 Stunden wurde, je nach Gruppe, die entsprechende ACSF perfundiert und dabei kontinuierlich der rCBF und das DC-Potential aufgezeichnet. Am Versuchsende wurde ein weiteres Mal das Schlauchsystem diskonnektiert, das kraniale Fenster wurde dicht verschlossen und die Tiere unter Bewahrung der Körpertemperatur und unter respiratorischer Zufuhr von Sauerstoff beobachtet.

Fünf Tiere erlagen den Folgen einer respiratorischen Insuffizienz. Die übrigen Tiere schliefen noch einige Stunden nach Versuchsende. Am ersten postoperativen Tag erlangten sie ihr Bewußtsein wieder und begannen zu trinken und sich zu putzen. 24 Stunden später wurden sie einer neurologischen Untersuchung unterzogen. Das Schema für die Gradeinteilung wurde der Arbeit von Menzies entnommen (Menzies et al., 1992).

Zur Fixation der Hirne wurde im Anschluß an das Experiment in Versuchsgruppe I (n=11) bei drei Tieren nach 24 Stunden und bei acht Tieren nach 48 Stunden und in den Kontrollgruppen II und III jeweils nach 48 Stunden eine kardiovaskuläre Perfusion durchgeführt.

Die fixierten Hirne wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten, histochemisch bzw. immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Pathophysiologische cerebrale Veränderungen durch das Entstehen der *cortical spreading ischaemia*

3.1.1 Einteilung der Gruppen

Die Vitalparameter der Tiere (MABP, pH-Wert, paO_2 , paCO_2) wurden während der Präparation im Normbereich gehalten.

Die 24 Tiere wurden in eine Versuchsgruppe und zwei Kontrollgruppen unterteilt, die sich durch die Zusammensetzung der ACSF voneinander unterschieden. Dabei wurden die Parameter Hämoglobin (Hb) und Kaliumkonzentration verändert. Zu Beginn der Messung betrug der Wert des regionalen cerebralen Blutflusses (rCBF) 100% (Ausgangsbloodflußniveau) und der Wert des DC-Potentials 0 mV.

Für die Berechnung der Blutfluß- und DC-Potentialveränderungen wurden die Daten aller 24 Versuchstiere mitberücksichtigt. Im Anschluß an die Experimente verstarben insgesamt 5 Tiere, die bei der histopathologischen Untersuchung nicht miteinbezogen wurden.

3.1.2 Versuchsgruppe

In **Gruppe I** (n=16) kam es während der Superfusion von **2 mmol/l Hb** und einer erhöhten **Kaliumkonzentration von 35 mmol/l** zu einem Abfall des rCBF auf $65 \pm 25\%$. 49 \pm 23 Minuten nach Superfusionsbeginn kam es zu mehreren spontanen CSIs. Diese waren charakterisiert durch eine negative DC-Potentialverschiebung und einen steilen Blutflußabfall. Die Amplitude der DC-Potentialverschiebung während der CSI betrug $-10,5 \pm 3,5$ mV und dauerte 23 \pm 12 Minuten an. Der Blutfluß fiel auf Werte von $22 \pm 9\%$ ab. Das cerebrale Blutflußniveau erholte sich allmählich, wobei das Ausgangsbloodflußniveau von 100% nach 63 \pm 42 Minuten wieder erreicht wurde.

In Abbildung 3 sind die typischen DC-Potential- und rCBF-Veränderungen einer CSI in der

Versuchsgruppe I dargestellt. Generell ging während der CSI die negative DC-Potentialverschiebung dem Abfall des rCBF entweder voraus (siehe Abb.3), oder beide Ereignisse begannen zum selben Zeitpunkt (siehe Abb.4). Der Blutflußabfall ging der negativen Potentialverschiebung jedoch niemals voraus.

Während des Beobachtungszeitraums von 3 Stunden sind zwischen einer und vier CSIs aufgetreten.

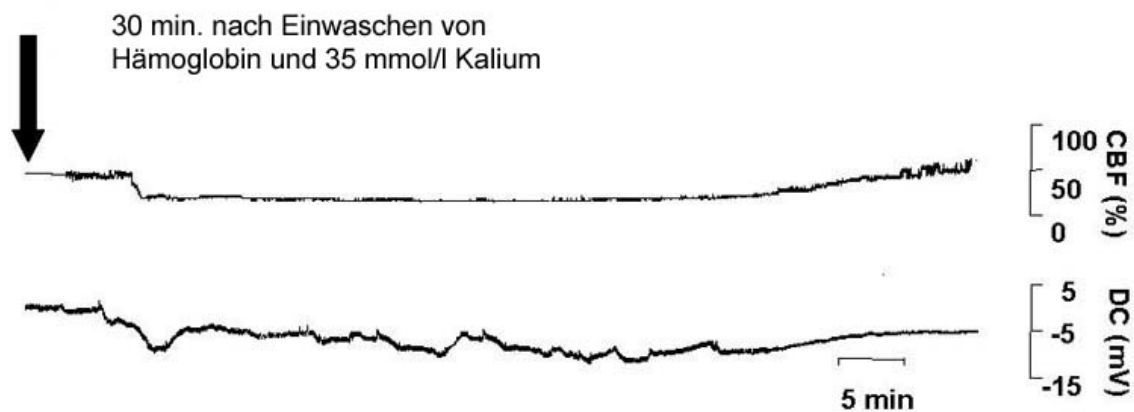


Abbildung 3: Verlauf einer CSI der Versuchsgruppe I. Die ACSF enthält Hb (2 mmol/l) und 35 mmol/l Kalium, was zu spontanen CSIs unter dem kranialen Fenster führte. Die negative DC-Potentialverschiebung ging in diesem Beispiel dem rCBF-Abfall um mehr als eine Minute voraus. (Die Ag-AgCl-Elektrode und die Laser-Doppler-Sonde sind wenige hundert Mikrometer über der Hirnrinde positioniert.)

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 5 der Kurvenverlauf einer CSD der Kontrollgruppe III zu sehen.

Fünf der 16 Versuchstiere starben innerhalb einiger Stunden nach dem Experiment. Elf Tiere überlebten. Bei zwei der elf überlebenden Tiere kam es zu einem wesentlich kürzeren Abfall des Blutflußniveaus als Antwort auf die sich ausbreitende neuronale Depolarisation. Die Zeit

zwischen dem steilem Blutflußabfall und der kompletten Erholung des Blutflusses betrug bei diesen zwei Tieren zwischen 2 und 13 Minuten. Zur Veranschaulichung zeigt die Abbildung 4 den Kurvenverlauf einer solchen kurzandauernden CSI. Bei der Messung zu dieser Abbildung wurden anstatt einer Lasersonde zwei Lasersonden in unterschiedlichen Bereichen des kranialen Fensters positioniert.

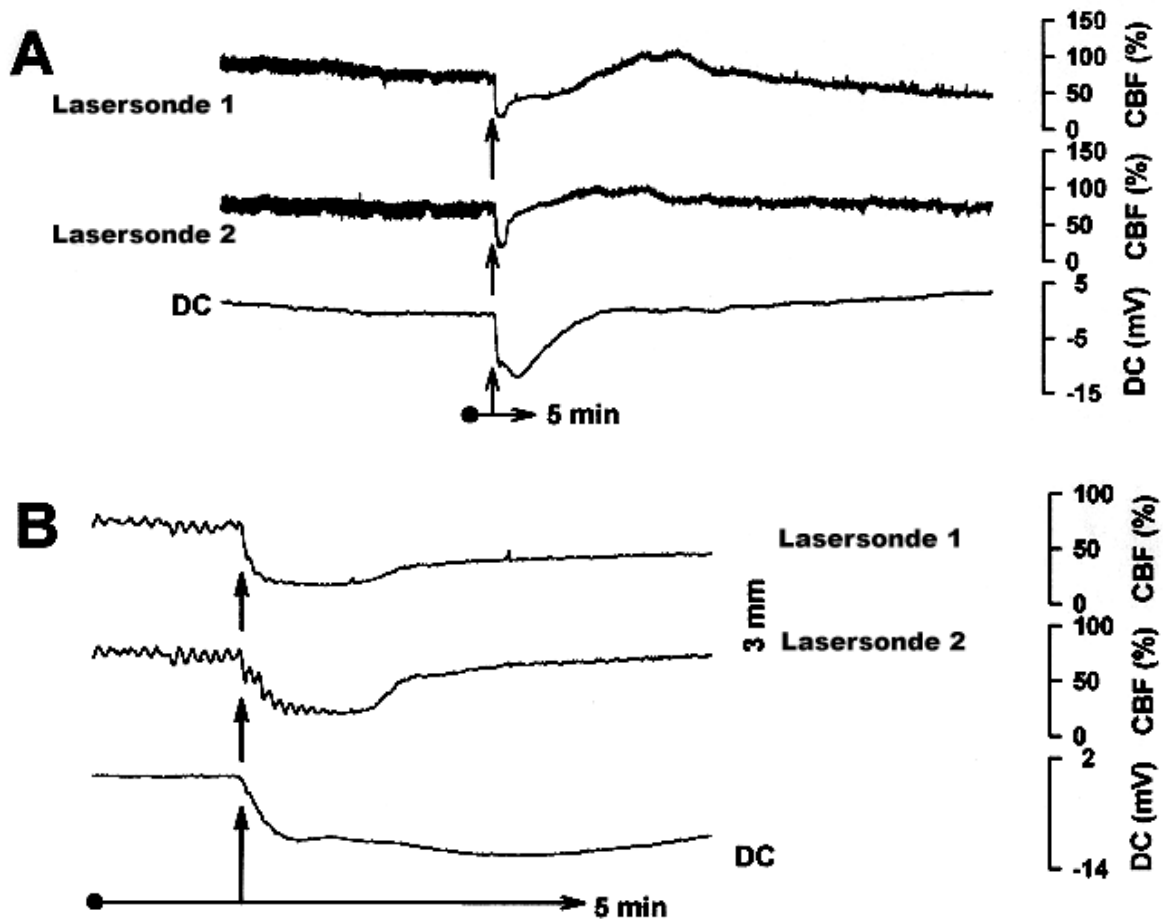


Abbildung 4A: Der Verlauf der CSI eines der beiden Tiere, das unter denselben Bedingungen wie die restlichen Tiere der Versuchsgruppe I eine wesentlich kürzere CSI entwickelte (siehe z. Vgl. Abb.3). Der Blutflußverlauf ist an zwei unterschiedlichen Stellen des Cortex gemessen worden. **B:** Die höhere Auflösung des Beginns der CSI zeigt, daß der DC-Potential- und der rCBF-Abfall in diesem Beispiel nahezu im selben Moment auftraten. Die Schwankung im Verlauf der rCBF-Kurve vor dem Auftreten der CSI weist auf Vasomotion hin, die nach der CSI typischerweise sistierte.

3.1.3 Kontrollgruppen

Die **Kontrollgruppe II** (n=3) wurde untersucht, um einen direkten zytotoxischen Effekt des Hämoglobins auf das Gehirnparenchym auszuschließen. Das Versuchsprotokoll war ähnlich dem der Versuchsgruppe I. Die für die Superfusion verwendete ACSF enthielt jedoch **2 mmol/l Hämoglobin** und eine physiologische **Kaliumkonzentration von 3 mmol/l**.

Im Verlauf des Einwaschens der ACSF fiel der rCBF im Bereich der Lasersonde auf Werte von $44 \pm 7\%$ ab.

Während des dreistündigen Beobachtungszeitraums war das DC-Potential stabil, und es traten weder eine CSD noch eine CSI auf.

Die **Kontrollgruppe III** (n=5) wurde untersucht, um auszuschließen, daß hohe subarachnoidale Kaliumkonzentrationen direkt zu einem cerebralen Gewebsschaden führen. Während der Superfusion der ACSF wurde hierbei die Kaliumkonzentration schrittweise gesteigert. Die ACSF enthielt **kein Hämoglobin** und aufsteigende **Kaliumkonzentrationen von 35, 50 und 80 mmol/l**. Während der Superfusion kam es zu einem kontinuierlichen rCBF-Anstieg auf $169 \pm 47\%$. Unter **35 mmol/l** und **50 mmol/l Kalium** traten in den ersten 90 Minuten keine CSDs auf. Unter **80 mmol/l Kalium** traten mit einem Abstand von circa 4 Minuten 6 ± 4 spontane CSDs auf. Als Blutflußantwort auf die CSD unter **80 mmol/l Kalium** konnte initial ein kurzer rCBF-Abfall von $169 \pm 47\%$ auf $83 \pm 19\%$ beobachtet werden. Ihm folgte ein circa zweiminütiger rCBF-Anstieg auf $219 \pm 71\%$ im Sinne einer *cortical spreading hyperaemia*. Die CSD-assoziierte negative DC-Potentialverschiebung betrug $-7,1 \pm 1,7$ mV und hielt $1,1 \pm 0,5$ Minuten an. Der DC-Potentialabfall ging dem Blutflußabfall entweder voraus oder beides trat zur selben Zeit auf. Der Kurvenverlauf einer solchen CSD-Abfolge ist in Abbildung 5 zu sehen.

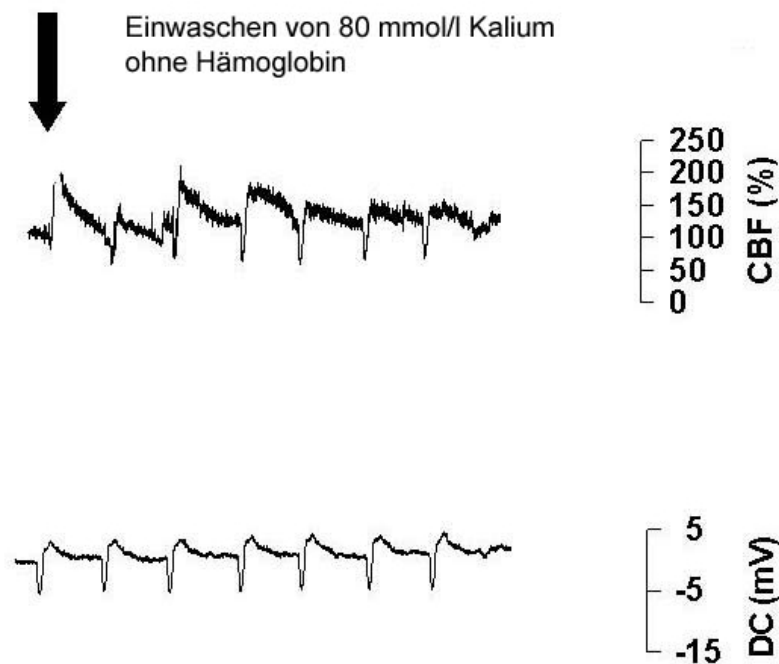


Abbildung 5: In Anwesenheit einer subarachnoidalen Kaliumkonzentration von 80 mmol/l konnte ein kurzer initialer rCBF-Abfall von $169 \pm 47\%$ auf $83 \pm 19\%$ beobachtet werden. Die darauffolgende cortical spreading hyperaemia betrug $219 \pm 71\%$. Die CSD-assoziierte negative DC-Potentialverschiebung betrug $-7,1 \pm 1,7$ mV und hielt $1,1 \pm 0,5$ Minuten an. Der DC-Potentialabfall ging dem Blutflußabfall entweder voraus, oder beide Phänomene traten zur gleichen Zeit auf.

3.2 Histopathologische cerebrale Veränderungen nach *cortical spreading ischaemia*

In der Versuchsgruppe I wurden drei Tiere 24 Stunden, die restlichen acht Tiere 48 Stunden nach dem Experiment in narkotisiertem Zustand durch kardiovaskuläre Perfusion getötet. Die Hirne der Tiere wurden in Fixationslösung konserviert und histologisch aufgearbeitet. Bei allen Tieren konnte im Bereich des kranialen Fensters eine Herniation des darunterliegenden Hirngewebes sowie eine meningeale Reizreaktion histologisch beobachtet werden. Diese

Aktivierungsreaktion konnte in beiden Hemisphären nachgewiesen werden, vorwiegend jedoch auf der ipsilateralen Seite des kranialen Fensters.

3.2.1 Versuchsgruppe

Bei der **Versuchsgruppe I** konnte bei neun von elf Versuchstieren im Rahmen der neurologischen Untersuchung, 24 Stunden nach dem Experiment, eine Hemiparese Grad $2,4 \pm 1,6$ (Gradeinteilung von 0 (kein neurologisches Defizit) bis 4 (hochgradige Parese)) festgestellt werden.

Bei den neun hemiparetischen Tieren zeigte die histologische Untersuchung das Auftreten kortikaler Hirninfarkte. Die Lokalisation und Ausbreitung der Infarkte ist in Abbildung 6A beispielhaft gezeigt. Das infarzierte Gebiet war bei der Mehrheit der Tiere größer als der Bereich unterhalb des kranialen Fensters (dieser Bereich ist in der Abbildung mittels eines Balkens gekennzeichnet). Nervenzell- bzw. Gliazellschäden waren in allen kortikalen Schichten nachweisbar. In einigen Fällen kam es auch zur Mitbeteiligung der angrenzenden weißen Substanz.

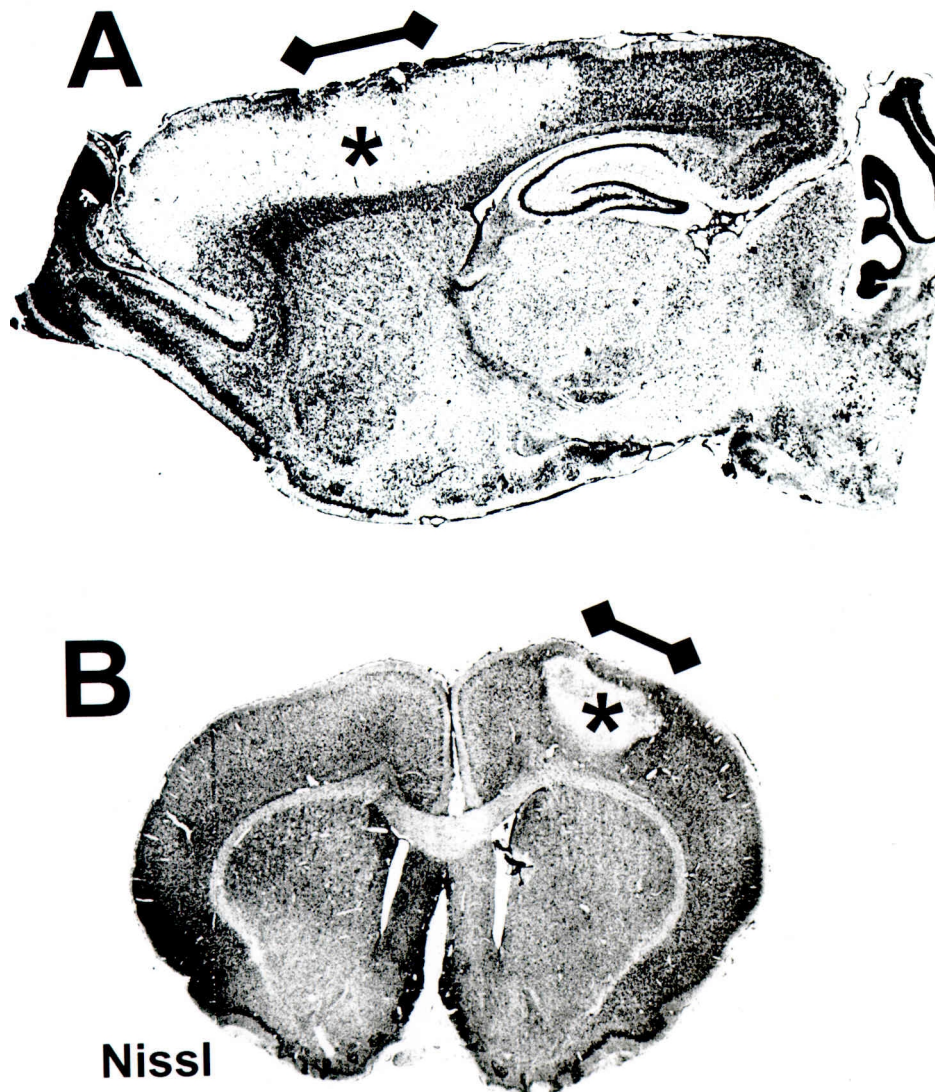


Abbildung 6: CSIs, die während der Superfusion einer ACSF mit Hb und erhöhter Kaliumkonzentration von 35 mmol/l auftraten, führten zu kortikalen Hirninfarkten. Die beiden abgebildeten Panoramaaufnahmen zeigen, 48 Stunden nach CSI, in der Hirnregion im Bereich des kranialen Fensters einen klar abgegrenzten kortikalen Infarkt. Der Balken kennzeichnet den Bereich des kranialen Fensters, der Stern die fokale kortikale Nekrose. **A:** sagitaler Hirnschnitt. Es ist zu sehen, daß der Infarkt über den Bereich des Fensters hinausgeht. **B:** koronarer Hirnschnitt (Kresylviolett (Nissl)-Färbung).

Eine stärkere Vergrößerung des infarzierten Cortexbereichs in HE-Färbung zeigt perivaskuläre spongiforme Veränderungen (Abb. 7A) und geschrumpfte hyperchromatische

azidophile Neurone (sogenannte *red neurons*). Diese Neurone weisen kondensierte pyknotische Zellkerne auf, die von perineuronalen Halos umgeben sind (Abb. 7B). Die Azidophilie der Neurone ist Folge des Affinitätsverlustes zu Hämatoxilin und Zeichen von Zellnekrose. Dieses Bild tritt typischerweise 24 Stunden nach fokaler Ischämie auf (Garcia et al., 1995).

Als weitere Färbemethode ist Kresylviolett-(Nissl) angewandt worden und in Abbildung 7C und 7D zu sehen. Diese Färbung ist insbesondere zur Sichtbarmachung von intrazellulären apoptotischen Zellabschnürungen geeignet. Die abgebildeten Neurone weisen in der Zelle kondensiertes Chromatin als Ausdruck apoptotischen Zytoplasmauntergangs auf. Weitere Merkmale für einen programmierten Zelltod (Apoptose) sind die erhaltenen Zellmembranen, die Abnahme des Zellvolumens sowie die Fragmentierung des Zellkerns (Bredesen, 1995).

Schließlich wurden die Präparate immunhistochemisch mit anti-*glial fibrillary acid protein* (GFAP)-Antikörper untersucht. Diese Methode dient der astrozytenspezifischen Darstellung von Zellaktivierung bzw. -nekrose. Auf diese Weise konnten Astrozytenveränderungen in der Versuchsgruppe und in den Kontrollgruppen im Bereich des kranialen Fensters genauer differenziert werden. Hierbei zeigte die Versuchsgruppe in der infarzierten Region eine Astrozytennekrose, die von aktivierten Astrozyten umgeben war (siehe Abb. 8A).

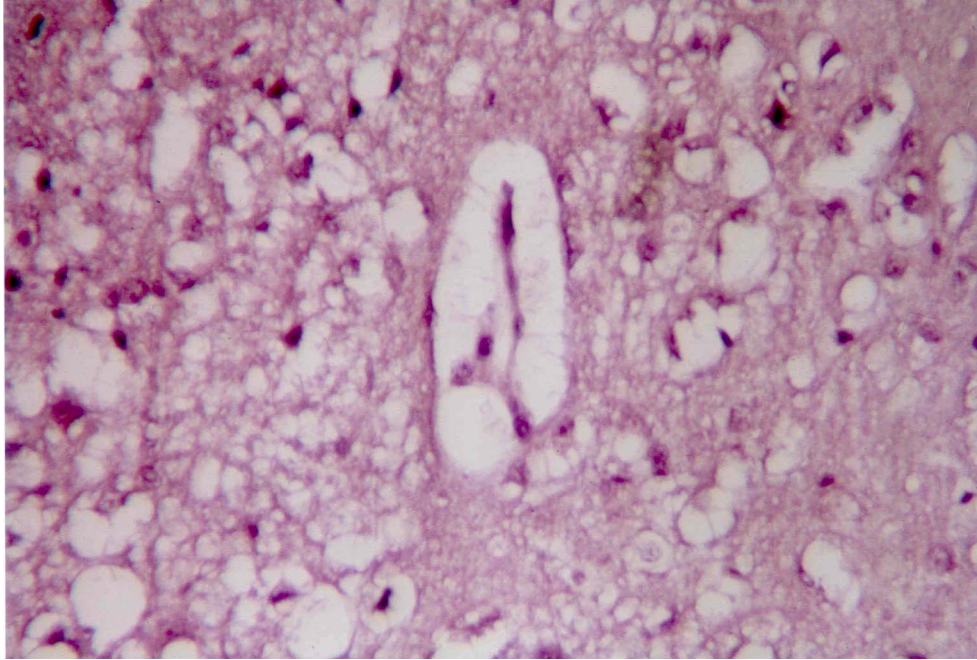


Abbildung 7A: 24 h nach CSI waren fokale cortikale Nekrosen nachweisbar. Die CSI wurde durch eine ACSF mit Hb und 35 mmol/l Kalium ausgelöst. Zu sehen sind perivaskuläre spongiforme Veränderungen und nekrotische Neurone mit perineuronalen Halos (H/E).

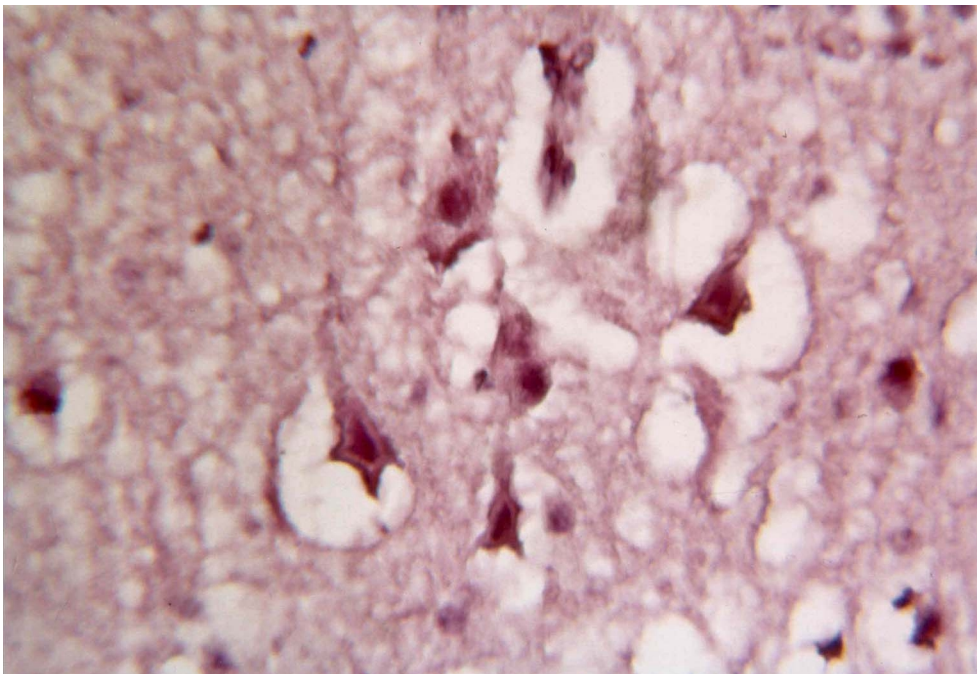


Abbildung 7B: Die stärkere Vergrößerung zeigt dieselbe Gewebsprobe mit geschrumpften, hyperchromatischen, azidophilen und nekrotischen Neuronen mit pyknotischen Zellkernen (sogenannte „red neurons“) (H/E).

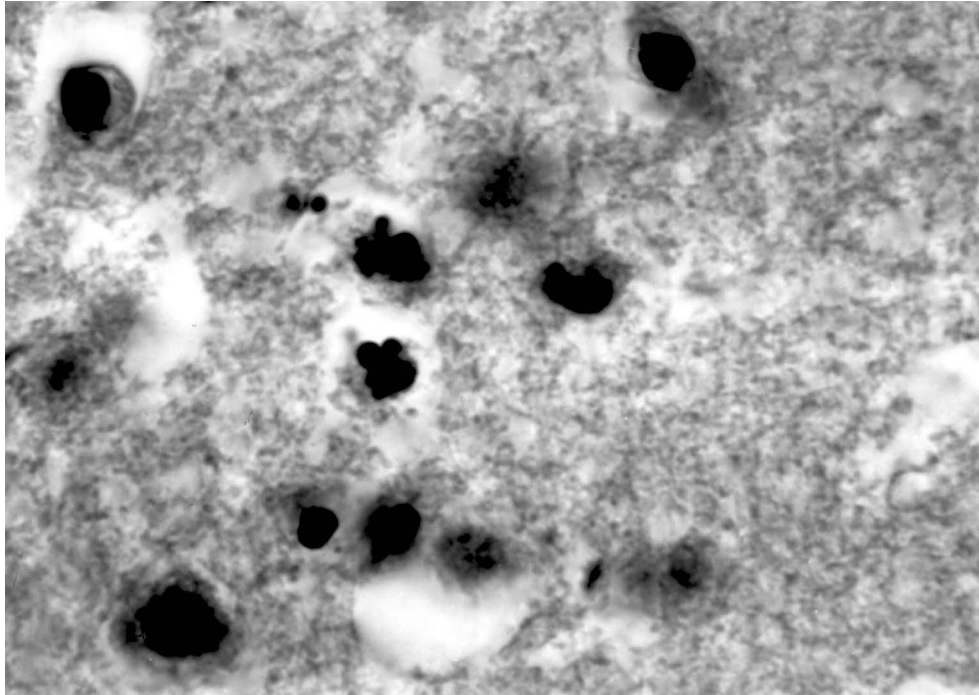


Abbildung 7C: Die hier abgebildeten Zellen zeigen einen weiteren Bereich des kortikalen Infarkts. Die abgebildeten Neurone weisen kondensiertes Chromatin als Ausdruck eines apoptotischen Zytoplasmauntergangs auf. Als weitere typische Merkmale der Apoptose sind erhaltene Zellgrenzen, Abnahme des Zellvolumens und Zellkernfragmentierung zu sehen (Kresylviolett-(Nissl)).

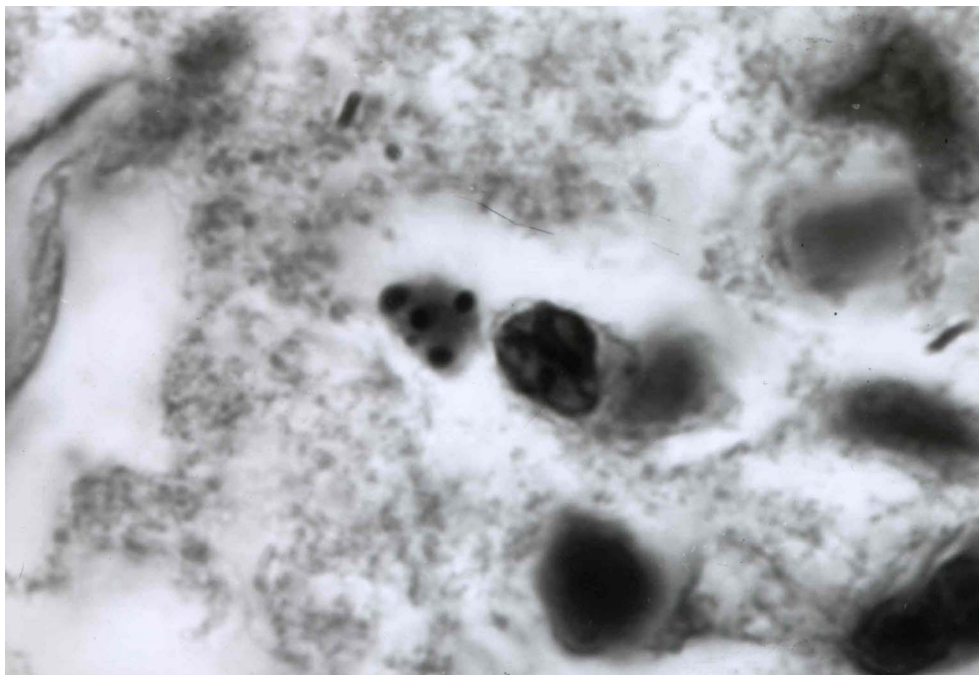


Abbildung 7D: Zu sehen sind die intrazellulären, apoptotischen Zellabschnürungen in einer höheren Auflösung, als Beispiel für Apoptose im Bereich des infarzierten Hirngewebes (Kresylviolett-(Nissl)).

Bei der histologischen Untersuchung zeigten lediglich zwei von den neun Versuchstieren eine CSI ohne histologischen Nachweis eines Hirninfarktes. Dabei handelte es sich um die bereits beschriebenen zwei Tiere, mit signifikant kürzerer CSI (siehe 3.2.1 bzw. Abb.4), bei denen der rCBF-Abfall nur 2 und 13 Minuten anhielt.

3.2.2 Kontrollgruppen

Die neurologische Untersuchung war bei den Tieren der **Kontrollgruppe II und III** unauffällig.

Nach kardiovaskulärer Perfusion der Kontrolltiere und folgender histologischer Aufarbeitung der Hirne konnten lichtmikroskopisch in beiden Kontrollgruppen lediglich vereinzelte perineuronale Halos in der äußeren kortikalen Zellschicht gefunden werden. Die hirnparenchymalen Strukturen der untersuchten Gewebeproben wiesen in keinem Bereich Nekrose von Nerven- bzw. Gliazellen auf.

In der Färbung mit GFAP-Antikörper zeigten beide Kontrollgruppen in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre multiple aktivierte Astrozyten, allerdings ohne den Nachweis von Astrozytennekrosen.

In **Abbildung 8A** ist der Cortex eines Tieres aus der Versuchsgruppe im Bereich des kranialen Fensters 48 Stunden nach CSI zu sehen. Die GFAP-Färbung zeigt den Untergang von Astrozyten, der scharf auf die infarzierte Region begrenzt ist und von aktivierten Astrozyten umgeben ist. In **Abbildung 8B** ist Hirngewebe des Cortex eines Tieres aus der Kontrollgruppe III zu sehen, bei dem es unter 80 mmol/l Kalium ohne Hämoglobin zu einer Reihe von CSDs gekommen ist. Dieser Cortexbereich unterhalb des kranialen Fensters weist 48 Stunden nach dem Experiment in der immunhistochemischen Färbung mit GFAP-Antikörper lediglich aktivierte Astrozyten auf.

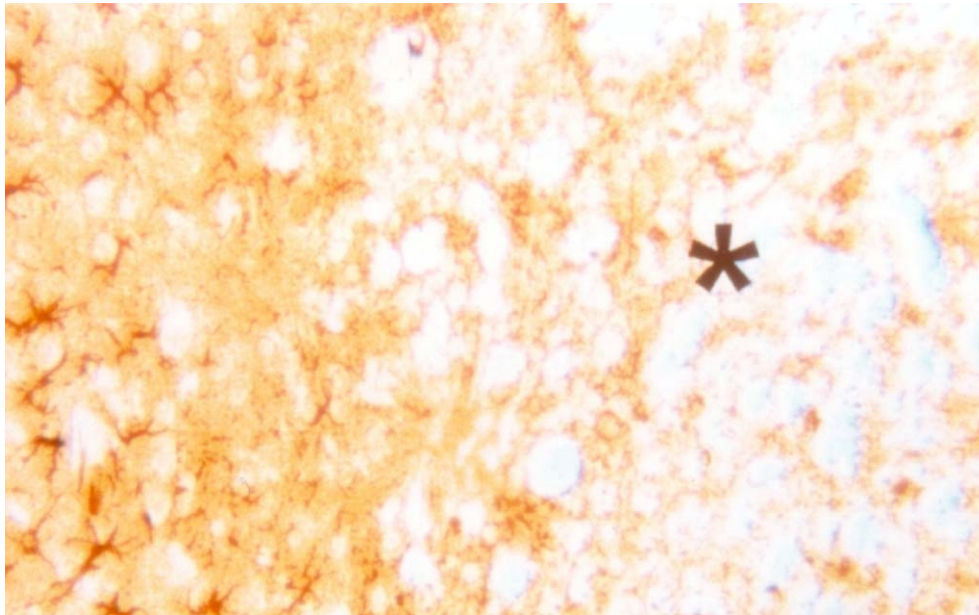


Abbildung 8A: Immunhistochemische Färbung mit GFAP-Antikörper. Zu sehen ist der Cortex eines Tieres aus der Versuchsgruppe im Bereich des kranialen Fensters 48 Stunden nach CSI. Die GFAP-Färbung zeigt den Untergang von Astrozyten, der scharf auf die infarzierte Region begrenzt (Stern) und von aktivierten Astrozyten umgeben ist.

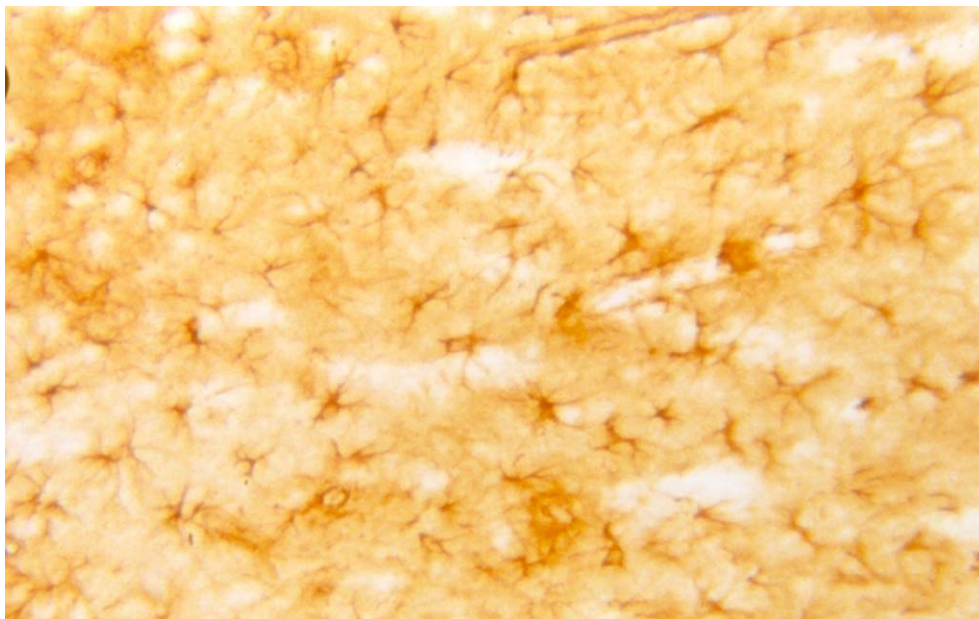


Abbildung 8B: Mit GFAP gefärbtes Hirngewebe des Cortex eines Tieres aus der Kontrollgruppe III, bei dem es unter 80 mmol/l Kalium ohne Hämoglobin zu einer Reihe von CSDs gekommen ist. Der Cortextbereich unterhalb des kranialen Fensters weist 48 Stunden nach dem Experiment lediglich aktivierte Astrozyten auf.

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden, unter Verwendung eines *in vivo*-Versuchsmodells an der Ratte, Veränderungen der elektrophysiologischen Spannungsverhältnisse am Cortex sowie der lokale cerebrale Blutfluß gemessen.

In der Versuchsgruppe I führte freies Hämoglobin gemeinsam mit einer erhöhten Kaliumkonzentration von 35 mmol/l im Subarachnoidalraum zur Entstehung von *cortical spreading ischaemias* (CSI). In den Kontrollgruppen II und III wurden weder bei der Anwesenheit von Hämoglobin mit einer physiologischen Kaliumkonzentration noch bei einer erhöhten Kaliumkonzentration ohne Hämoglobin CSIs beobachtet. In der Kontrollgruppe II fiel der rCBF nach dem Einwaschen einer ACSF mit 2 mmol/l Hämoglobin auf $44 \pm 7\%$ ab, in der Kontrollgruppe III traten bei einer ACSF mit 80 mmol/l Kalium ohne Hämoglobin spontan CSDs auf.

Die histologische Untersuchung der Hirne der Versuchsgruppe I zeigte cortikale Hirninfarkte. Diese corticalen Läsionen der betroffenen Hemisphäre wiesen die typischen Merkmale einer fokalen cerebralen Ischämie auf. Dabei handelte es sich beispielsweise um das Auftreten von Hirnödem, azidophilen Neuronen mit kondensierten Zellkernen, Astrozytennekrosen und apoptotischen Zellen (Bredesen, 1995; Garcia et al., 1995; Li et al., 1995; Spielmeyer, 1925). Im Gegensatz dazu konnte in der Kontrollgruppe II und III lediglich eine Astrozytenaktivierung ohne Zellnekrosen gefunden werden.

Freies Oxy-Hämoglobin ist ein bekannter NO⁻-Senker, da seine Häm-Gruppe NO⁻ mit einer mindestens 10.000fach höheren Affinität bindet als Sauerstoff (Perutz, 1996). Im Zusammenhang mit den vorgestellten Experimenten in dieser Arbeit war insbesondere die daraus resultierende Vasokonstriktion von Interesse. In der folgenden Diskussion erfolgt die kritische Einschätzung und Erörterung der CSI-Entstehung und der daran beteiligten Substanzen sowie deren möglicher klinischer Zusammenhang mit dem sogenannten *delayed ischaemic neurological deficit* (DIND) nach SAB und Migräne-induzierten Infarkten.

4.1 Pathomechanismus der *cortical spreading ischaemia*: Wirkung und Interaktion von Kaliumionen, NO[•] und Hämoglobin

Über den komplexen zellulären Mechanismus der CSI ist wenig bekannt. Allerdings scheint es durch eine gestörte Kopplung zwischen Metabolismus und Blutfluß während der Depolarisation des astrozytär-neuronalen Netzwerks zu einer Vasokonstriktion und in weiterer Folge zur Ischämie zu kommen.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, tritt während des Ablaufs einer CSI die Depolarisation des Hirnparenchyms entweder vor oder gemeinsam mit dem Blutflußabfall auf (Abb. 3 und 4), jedoch niemals nach dem Blutflußabfall. Dies steht im Gegensatz sowohl zur anoxischen Depolarisation als auch zu Periinfarktdepolarisationen, die im Bereich von Minuten nach einer Gefäßokklusion im Rahmen der fokalen Infarktentstehung auftreten (Back et al., 1998; Lauritzen, 1994). Eine Erklärungsmöglichkeit für den zeitlichen Zusammenhang von Depolarisation und Blutflußabfall während einer CSI besteht darin, daß es durch die Reizung des astrozytär-neuronalen Netzwerks zur Ausschüttung von vasokonstringierenden Substanzen kommt, die wiederum einen Blutflußabfall hervorrufen. Ein interessanter Kandidat für die Vasokonstriktion ist dabei die extrazelluläre Kaliumkonzentration, die während der CSD von 3 mmol/l auf bis zu 60 mmol/l ansteigt (Hansen et al., 1980; Kraig und Nicholson, 1978). Es ist beschrieben worden, daß eine extrazelluläre Konzentration von Kaliumionen über 20 mmol/l vasokonstriktorisch wirkt (McCulloch et al., 1982). Unter physiologischen Bedingungen bewirkt die erhöhte Kaliumkonzentration nach CSD eine Freisetzung des Vasodilators NO[•] (Dickie et al., 1990), was wiederum dem vasokonstriktiven Effekt der hohen Kaliumkonzentration entgegenwirkt. Während der CSI fällt dieser Mechanismus weg, da ihre Entstehung mit einer reduzierten cerebralen NO[•]-Aktivität (entweder durch den NOS-Inhibitor L-NNA oder den NO[•]-scavenger Hämoglobin) verbunden ist. Dieser Zusammenhang zwischen Kalium und NO[•] ist bereits in *in vitro*-Arbeiten an isolierten Hundearterien untersucht worden und ergab, daß eine reduzierte NO[•]-Aktivität die vasokonstringierende Wirkung der hohen Kaliumkonzentration verstärkt (Minato et al., 1995). Ebenso verstärkt der NO[•]-scavenger Hämoglobin *in vitro* die vasokonstringierende Wirkung der hohen Kaliumkonzentration an isolierten Arterien vom Schwein (Nishiye et al., 1989).

Unter sonst normalen Bedingungen führt der CSD-induzierte Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration in Anwesenheit eines NOS-Inhibitors lediglich zu einer initialen Hypoperfusion (Duckrow, 1993). Wenn zusätzlich zu der herabgesetzten NO^- -Konzentration die Repolarisation des neuronal-glialen Netzwerks durch eine gestörte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase teilweise gehemmt ist, kommt es zu einer verlängerten Kalium-induzierten Vasokonstriktion. Dabei könnte die erhöhte extrazelluläre Baseline-Kaliumkonzentration direkt hemmend auf die Na^+/K^+ -ATPase wirken (Hajek et al., 1996). Wenn diese vasokonstriktive Phase über einen gewissen Zeitraum anhält, resultiert ein Erschöpfen der Sauerstoff- und Glukosevorräte der Neurone und Astrozyten. Kommt es schließlich wieder zur Repolarisation, fällt der vasokonstriktorische Reiz weg, und die Durchblutung setzt wieder ein.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen Kaliumionen und NO^- besteht auch in bezug auf die Auslöseschwelle der CSD. Während der Kaliumschwellenwert zum Auslösen einer CSD in Anwesenheit von Hämoglobin oder L-NNA zwischen 20 und 35 mmol/l liegt, beträgt er in der hier vorliegenden Arbeit in der Kontrollgruppe III, ohne die Anwesenheit eines NO^- -senkenden Agens, zwischen 50 und 80 mmol/l. Der herabgesetzte Kaliumschwellenwert für das Auslösen einer CSD durch die Anwesenheit von NO^- -senkenden Agenzien in der ACSF kann mit dem reduzierten cerebralen Blutflußniveau zusammenhängen. Durch die Minderperfusion bedingt, könnte es zu einer gestörten Freisetzung von Kaliumionen aus den glialen Endfüßchen in das Gefäßsystem kommen (Paulson und Newman, 1987). Dadurch nimmt der Kaliumabtransport über das Blut ab, und es resultiert ein Persistieren der erhöhten subarachnoidalen Kaliumkonzentration. Ein weiterer möglicher Mechanismus des herabgesetzten Kaliumschwellenwertes durch die reduzierte NO^- -Konzentration könnte auf Rezeptorebene stattfinden. Eine Abnahme der NO^- -Konzentration bewirkt wahrscheinlich eine Aufhebung der NO^- -vermittelten Herabregulation des N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptors über seine Redoxstelle (Lipton et al., 1993). Es könnte infolge dessen zu einer Zunahme des agonistischen Effekts von Glutamat am NMDA-Rezeptor kommen. Dies ist insofern von Bedeutung, als bei der Entstehung und Verbreitung der CSD in allen bislang untersuchten Spezies der NMDA-Rezeptor eine wichtige Rolle spielt (Avoli et al., 1991; Lauritzen, 1994; Lauritzen und Hansen, 1992).

Das Ausmaß des rCBF-Abfalls während der CSI verhielt sich bei dem Versuchsprotokoll mit

L-NNA unterschiedlich zu dem der hier vorliegenden Versuchsgruppe mit Hämoglobin. Die Hypoperfusionen der CSIs waren mit Hämoglobin ausgeprägter als mit L-NNA (Dreier et al., 1998). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß nicht nur eine verminderte NO'-Konzentration bei der Entstehung der ischämischen Blutflußantwort eine Rolle spielt, sondern auch zusätzlich vasokonstriktive Eigenschaften des Hämoglobins beteiligt sind. Zu diesen Eigenschaften werden u.a. die Freisetzung von vasoaktiven Eicosanoiden und Endothelin aus der Gefäßwand, die Hemmung der Endothel-abhängigen Gefäßrelaxation, das Auslösen von strukturellen Schäden der Arterienwand und die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen gezählt (Macdonald und Weir, 1991; Zabramski, 1997).

4.2 Die Entstehung und der Nachweis von cortikalen Infarkten infolge der *cortical spreading ischaemia*

Wie die histologische Untersuchung der Rattenhirne ergab, führten CSIs unter Hämoglobin und hoher Kaliumkonzentration zu charakteristischen morphologischen Veränderungen; eine Nekrose demarkierte sich klar nach 24 Stunden in der Hirnregion unterhalb des kranialen Fensters und in den angrenzenden Bereichen. Nach 48 Stunden war die Gewebsstruktur im Ischämiekerngebiet nicht mehr vorhanden (Abb. 6). Nekrotische Neurone waren nach 48 Stunden, insbesondere im Ischämiekerngebiet, reichlich vorhanden. Lichtmikroskopisch war im Ischämiebereich sowohl nekrotischer als auch apoptotischer Zelluntergang (Hämatoxylin-Eosin und Kresylviolett-(Nissl) Färbung) nachweisbar, wobei quantitativ der nekrotische Zelluntergang überwog. Darüber hinaus konnte in diesem Bereich eine große Anzahl von phagozytotischen Mikrogliazellen und Makrophagen sowie der Untergang von Astrozyten beobachtet werden.

In der immunhistochemischen Untersuchung mit GFAP-Antikörper zur Darstellung der Astrozytenzellveränderungen zeigten die Kontrolltiere bis auf eine cortikale Astrozytenzellaktivierung keine weitere signifikante zelluläre Schädigung. Diese aktivierten Astrozyten konnten im Hirnparenchym beider Hemisphären bei allen Tieren nachgewiesen werden und sind als Reaktion auf die Präparation des kranialen Fensters zu deuten. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sind ein weiteres Indiz dafür, daß es bei den Kontrolltieren in

Folge von CSDs nicht zu einer Zellschädigung, sondern lediglich zu einer Zellaktivierung der Astrozyten kam, die wahrscheinlich Folge der Fensterpräparation ist. Andererseits zeigte die GFAP-Färbung der Versuchstiere, bei denen CSIs aufgetreten waren, den scharf auf die infarzierte Region begrenzten Untergang von Astrozyten. Auch in den Hirnpräparaten der Versuchsgruppe konnten aktivierte Astrozyten in beiden Hemisphären gefunden werden.

Die Anwendung weiterer immunhistochemischer Färbungen der Hirnpräparate ist unlängst veröffentlicht worden (Dreier et al., 2000). Dabei konnte das Auftreten von *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphat nick-end labeling* (TUNEL)-positiven Zellen und kugelförmigen Zellfragmenten beobachtet werden. Der Hauptanteil der TUNEL-positiven Zellen stellte geschädigte Neurone dar. Die Färbung mit anti-*ionized calcium binding adaptor molecule* (iba1)-Antikörper zeigte aktivierte Mikrogliazellen in beiden Hemisphären sowie eine große Anzahl von phagozytierter Mikroglia und anderen Makrophagen im Infarktgebiet. Im Gegensatz dazu konnte bei der Untersuchung der Gehirne der Kontrollgruppen auch im Bereich der Mikroglia und Neurone keine Zellschädigung nachgewiesen werden (Dreier et al., 2000).

Aus diesen histologischen Ergebnissen geht hervor, daß das Auftreten einer kortikalen Depolarisation bei gestörter Kopplung zwischen dem Hirnmetabolismus und dem cerebralen Blutfluß (CSI), im Gegensatz zur CSD mit funktionierender cerebraler Gefäßreaktivität, zu einer kortikalen Infarzierung führt. Mit den gegebenen methodischen Möglichkeiten ergab die Beurteilung der histopathologischen Veränderungen im kortikalen Infarktbereich das gleiche Muster von Zellschäden, wie es bei Infarkten infolge eines embolischen bzw. thrombotischen Gefäßverschlusses beobachtet wird (Garcia et al., 1995; Li et al., 1995; Spielmeyer, 1925).

4.3 Der mögliche Zusammenhang von *cortical spreading ischaemia* und dem *delayed ischaemic neurological deficit* nach Subarachnoidalblutung

Im Verlauf einer Subarachnoidalblutung (SAB) kommt es, mit einem Maximum am siebten posthämorrhagischen Tag, zu einer Lyse der Erythrozyten. Dieses Geschehen korreliert zeitlich mit dem Auftreten des verzögerten ischämisch bedingten neurologischen Defizits,

dem sogenannten *delayed ischaemic neurological deficit* (DIND), welches eine gefürchtete Komplikation darstellt (Kassell et al., 1990). Für das Entstehen des DIND werden besonders starke und lange Vasospasmen verantwortlich gemacht, für die ein kausaler Zusammenhang mit hämolytisch freigesetzten Substanzen vermutet wird (Macdonald, 1997; Zabramski, 1997). Zu den Substanzen, die im Verlauf einer Hämolyse in den Extrazellulärraum freigesetzt werden, gehören u.a. Hämoglobin und Kaliumionen.

Bei der Entstehung des DIND wird das Hämoglobin als einer der wichtigsten Faktoren angesehen (Macdonald und Weir, 1991; Zabramski, 1997). Es kommt mit einer Konzentration von 21 mmol/l im Erythrozyten vor. Nach einer SAB kommt es zur subarachnoidalen Akkumulation des freien Hämoglobins, welche am siebten Tag ihr Maximum erreicht (Pluta et al., 1998). Die hierbei gemessenen Konzentrationen reichen von 500 µmol/l im subarachnoidalen Hämatom (Ohta et al., 1983) bis 100 µmol/l im perivaskulären Raum (Pluta et al., 1998) und 30 µmol/l im Liquor (Ohta et al., 1980). Die Hämoglobinkonzentration, die in dem hier vorliegenden Versuchsprotokoll verwandt wurde, ist viermal höher als diejenige, die beim Menschen in subarachnoidalen Gerinnseln nach SAB gemessen wurde. Dieses Vorgehen hatte zweierlei Gründe. Zum einen entwickelten 100% der Tiere in der Versuchsgruppe unter diesen Bedingungen eine CSI, von denen 82% in der darauffolgenden histologischen Untersuchung einen Hirninfarkt aufwiesen. Dabei war die Auftrittshäufigkeit wesentlich höher als die der kortikalen Infarkte bei nicht-therapierten SAB-Patienten (20-30%) (Kassell et al., 1990). Durch diese erhöhte Auftrittshäufigkeit im Rahmen der Untersuchungen zu dieser Arbeit waren die Ergebnisse statistisch klar und konnten aussagekräftig miteinander verglichen werden. Zum anderen war die Inkubationszeit von Hämoglobin während der Experimente mit drei Stunden wesentlich kürzer als die Anwesenheit von subarachnoidalem Hämoglobin nach einer SAB.

Ohta und Mitarbeiter haben im zeitlichen Verlauf nach SAB einen Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration von 3 auf bis zu 50 mmol/l in den intracerebralen Hämatomen neurochirurgischer Patienten gemessen. Diese Werte waren die Basis für die gewählte Kaliumkonzentrationssteigerung, die nach einigen Pilotversuchen auf 35 mmol/l festgelegt wurde und in dieser Konzentration in Kombination mit Hämoglobin auch zu den gewünschten CSIs führte. In Zusammenhang mit der Entstehung des DIND gibt es in der Literatur allerdings kaum Arbeiten über die Bedeutung der subarachnoidalen Kaliumkonzentration.

Eine Reihe von neueren Untersuchungen über die Entstehung des DIND gibt Anlaß zu der Vermutung, daß auch weitere Hämolysefaktoren für die gestörte cerebrale Blutflußsituation verantwortlich sind. Dazu gehören u.a. die Abnahme von intracortikaler extrazellulärer Glukose und der Anstieg von extrazellulärem Glutamat (Nilsson et al., 1999; Sarrafzadeh et al., 1998) sowie das Entstehen einer Hyponatriämie (Wijdicks et al., 1985) bei Patienten nach SAB. Diese Faktoren induzieren auch die Entstehung von CSDs im Tierexperiment (Bures et al., 1974; Hansen und Lauritzen, 1984; Marshall, 1959).

Bislang lag der Forschungsschwerpunkt des DIND auf dem in der Angiographie sichtbaren Vasospasmus und nicht auf einer gestörten cerebralen Mikrozirkulation. Im Bereich der Mikrozirkulation ist ein Vasospasmus auch ohne angiographischen Nachweis möglich (Zabramski, 1997). Da bei der überwiegenden Anzahl der SAB-Patienten weitverteilte cortikale Mikroinfarkte auftreten (Neil-Dwyer et al., 1994; Stoltenburg-Didinger und Schwarz, 1987), spricht einiges dafür, daß eine Blutflußstörung im Bereich der cerebralen Mikrozirkulation bedeutsam ist. Dies steht im Gegensatz zu einer thrombotischen bzw. embolischen Genese, bei der es typischerweise zu cerebralen Territorialinfarkten kommt. Vergleicht man nun das histologische Bild des DIND mit dem der CSI, so zeigt sich ein entsprechendes cortikales Schadensmuster. Ein Beispiel für die spongiformen Veränderungen der perivaskulären Region nach CSI ist in Abb. 7A und 7B zu sehen. Ein nahezu identisches Bild findet sich in einer Veröffentlichung von Neil-Dwyer (Neil-Dwyer et al., 1994), welches die histologischen Veränderungen des DIND beim Menschen darstellt.

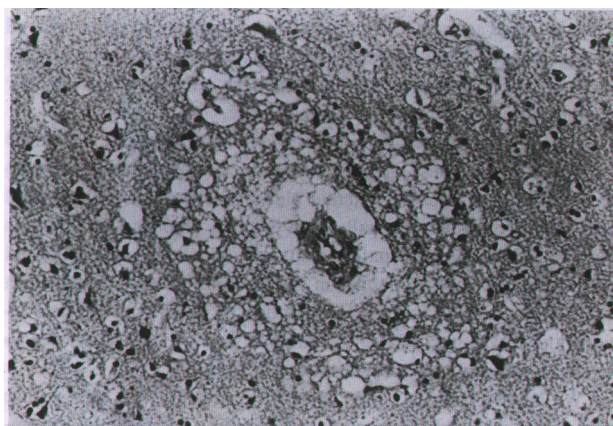


Abbildung 9: Aus Neil-Dwyer et al., *Delayed cerebral ischemia: the pathological substrate. Acta Neurochir (Wien)1994*

In der Literatur werden 57 Versuchsmodelle zur Untersuchung des Vasospasmus nach SAB angeführt. Dabei handelt es sich bei der Mehrzahl um *in-vivo*-Modelle an Mäusen, Ratten, Kaninchen, Katzen, Schweinen, Hunden bzw. Primaten. Da die Primaten phylogenetisch dem Menschen am nächsten verwandt sind, hat das Primatenmodell am meisten Aufschluß über die pathophysiologische Entstehung des Vasospasmus erbracht. Allerdings sind bei diesem Modell die hohen Kosten und die ethischen Richtlinien zu bedenken, so daß *in-vivo*-Modelle an Ratten, Hunden und Schweinen ebenso von großer Bedeutung sind (Megyesi et al., 2000). Darüber hinaus fehlt in diesen experimentellen Modellen der Nachweis dafür, daß es als Folge des Vasospasmus überhaupt zu cerebralen Ischämien kam. In dem meist verwandten Vasospasmusmodell am Hund konnte in einer im Jahre 1993 durchgeführten Studie das Auftreten neurologischer Defizite nicht gezeigt werden (Kaoutzanis et al., 1993). In dieser Arbeit wurde ein *in-vivo*-Modell an der Ratte entwickelt, bei dem der cerebrale Vasospasmus nach SAB durch intracraniale Applikation von freiem Hämoglobin und einer erhöhten Kaliumkonzentration simuliert und untersucht wurde. Das Modell ist in dieser Form neuartig und dient im Zusammenhang mit der Entstehung des Vasospasmus vornehmlich zur Untersuchung der Rolle des Oxyhämoglobins und des Kaliums. Es gibt darüberhinaus eine große Anzahl von *in-vitro*- und *in-vivo*-Arbeiten, die sich mit der Rolle von u.a. Endothelin, endothelabhängiger Gefäßerweiterung, Bilirubin, Methämoglobin, Vasoproliferation, neurogenen Effekten und freien Radikalen bei der Entstehung des DIND beschäftigen (Macdonald und Weir, 1991).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Hypothese der CSI als möglicher Pathomechanismus des DIND durch zwei Besonderheiten des cerebralen Metabolismus nach einer SAB unterstützt wird. Zum einen kommt es im Rahmen einer SAB zu einer Reihe von Störfaktoren des cerebro-vaskulären Systems. Hierbei könnte es durch die Freisetzung von vasoaktiven und exzitatorischen Substanzen zu einem herabgesetzten Schwellenwert für das Entstehen von Depolarisationswellen im astrozytär-neuronalen Netzwerk kommen. Dies könnte durch die vasospasmusbedingte Minderperfusion bestimmter Gehirnareale, die gesteigerte extrazelluläre Kalium- und Glutamatkonzentration, die herabgesetzte extrazelluläre Glukosekonzentration und das Auftreten von Hyponatriämie bedingt sein. Zum anderen könnte eine gestörte Kopplung zwischen Metabolismus und Blutfluß bei SAB dazu führen, daß die vasospastischen Arterien mit einer ähnlichen ischämischen Hypoperfusion auf die cortikale Depolarisation reagieren, wie es in dem hier vorliegenden CSI-Modell

beobachtet wurde.

4.4 Der mögliche Zusammenhang zwischen den cortikalen Infarkten bei CSI und Migräne-induzierten Infarkten

Die Migräne-induzierten Infarkte stellen ein cerebrales Infarktsyndrom dar, bei dem es aus bislang noch ungeklärter Ursache zur Entstehung meist cortikaler Infarkte im Posteriorstrombahngebiet kommt. Aus klinischen epidemiologischen Studien geht hervor, daß Migränepatienten ein erhöhtes Risiko haben, ischämische Schlaganfälle zu erleiden (Buring et al., 1995; Merikangas et al., 1997; Tzourio et al., 1995). Es besteht bei Migränepatienten mit Aura ein signifikant höheres Risiko als bei Patienten ohne Aura (Carolei et al., 1996).

Es wird angenommen, daß das pathophysiologische Korrelat der Migräneaura im neuronal-astrozytären Netzwerk entspringt und zu sekundären Gefäßveränderungen führt (Lauritzen, 1994; Leão und Morison, 1945; Moskowitz und Macfarlane, 1993). Im Zusammenhang mit der „Spreading Depression“-Theorie der Migräneaura geht man davon aus, daß die cortikale Depolarisationswelle eine Hypoperfusion, die sogenannte *spreading oligoemia*, hervorruft (Lauritzen, 1994). Es bleibt allerdings ungeklärt, warum sich die fokale Hypoperfusion in einigen seltenen Fällen zu Migräne-induzierten Infarkten entwickelt. Aus klinischen Daten geht hervor, daß sich die Beforschung der Migräne-induzierten Infarkte eher auf ein gestörtes Zusammenspiel zwischen neuronalem Metabolismus und cerebralem Blutfluß konzentrieren sollte. Persistiert dieses gestörte Zusammenspiel, könnte daraus eine irreversible Zellnekrose resultieren (Bogousslavsky et al., 1988). Möglicherweise besteht hierbei ein Zusammenhang mit dem Pathomechanismus der CSI.

Selbstverständlich bleibt hierbei anzumerken, daß es sich bei dem CSI-Modell dieser Arbeit um ein Modell an der Ratte handelt und die Kombination aus einer lokal reduzierten NO-Konzentration und einer erhöhten Kaliumkonzentration eine artifizielle Bedingung darstellt. Daher ist der Bezug zu einem klinischen Syndrom beim Menschen nur mit Vorsicht herzustellen.

4.5 Ausblick

Aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe geht hervor, daß es durch die lokale Gabe des Vasodilatators Nimodipin möglich ist, die CSI wieder in eine CSD mit *cortical spreading hyperaemia* (CSH) zurückzuverwandeln (Dreier et al., 1998). Die unter Nimodipin aufgetretenen CSDs unterschieden sich von regulären CSDs nur noch durch eine sehr kurze initiale Hypoperfusion. Eine langandauernde Minderperfusion und eine Negativierung des DC-Potentials traten nicht mehr auf. Die klinische Bedeutung des Kalziumkanalblockers Nimodipin besteht primär in der prophylaktischen Behandlung des DIND nach SAB. Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse der existierenden klinischen Studien zu Nimodipin, die 2756 Patienten umfaßte, ergab ein geringeres Auftreten des DIND nach SAB in der mit Nimodipin behandelten Patientengruppe. Der angiographisch sichtbare Vasospasmus konnte durch Nimodipin im Gegensatz zu Frequenz und Schwere des DIND allerdings nicht beeinflußt werden (Feigin et al., 1998). Daß die Gabe von Nimodipin die CSI in eine CSD zurückverwandelt, könnte einen weiteren Hinweis für einen möglichen Zusammenhang zwischen CSI und DIND liefern. Hierbei scheint es durch die Blockade der spannungsabhängigen Kalziumkanäle möglich zu sein, die in der CSI auftretende massive Vasokonstriktion zu hemmen. Ein besseres Verständnis des Pathomechanismus des DIND könnte speziell in bezug auf eine mögliche Konsequenz bei der pharmakologischen Behandlung dieser gefürchteten Komplikation von Bedeutung sein. Denn die Letalität des DIND liegt trotz intensivmedizinischer Therapieverfahren weiterhin bei mehr als 10% (Macdonald, 1997)

Um in Zukunft weitere Faktoren, die an dem Entstehungs- und Ausbreitungsmechanismus der CSI beteiligt sind, zu untersuchen, könnte das in dieser Arbeit entwickelte Versuchsprotokoll angewandt werden. So wäre es beispielsweise interessant, den Einfluß von Substanzen wie Serotonin und Glutamat sowie Elektrolytverschiebungen (Hyponatriämie) bei der Entstehung der CSI zu studieren. In neueren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die Rolle von Glukose im Zusammenhang mit der CSI-Entstehung untersucht, da auch eine Glukoseerniedrigung CSDs auslösen kann (Astrup und Norberg, 1976; Dreier et al., 2000). Es konnte dabei gezeigt werden, daß auch die Superfusion einer ACSF mit einer niedrigen Glukosekonzentration (0,8 mmol/l) in Kombination mit Hämoglobin das Entstehen von CSIs hervorrufen konnte, obwohl die subarachnoidale Kaliumkonzentration physiologisch war.

5 Zusammenfassung

Die Regulation des cerebralen Blutflusses ist ein komplexer Prozeß, an dem eine Vielzahl von Mediatoren und Regulationsmechanismen beteiligt ist. Bei einer Störung der kortikalen Ionenhomöostase, wie es beispielsweise bei der *cortical spreading depression* (CSD) der Fall ist, kann es zu charakteristischen Veränderungen des regionalen cerebralen Blutflusses (rCBF) kommen. Diese CSD-abhängige mehrphasige Blutflußantwort setzt sich aus einer initialen variablen geringgradigen Hypoperfusion, gefolgt von einer akuten Hyperperfusion, der *cortical spreading hyperaemia*, und einer nachfolgenden Hypoperfusion, der *cortical spreading oligoemia*, zusammen. Wahrscheinlich kommt es aufgrund dieses rCBF-Verhaltens infolge von CSDs im Hirncortex nicht zu Parenchymschäden.

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Rattenmodell der rCBF im Verlauf der CSD gemessen. Hierbei bestand das Interesse, durch die Veränderung der artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF) Einfluß auf die CSD-abhängige Blutflußantwort zu nehmen. Unter Thiopentalnarkose wurde den Tieren eine ACSF in den künstlich geschaffenen Subarachnoidalraum perfundiert. Diese ACSF enthielt eine erhöhte Kaliumkonzentration von 35 mmol/l und 2 mmol/l freies Hämoglobin. Das freie Hämoglobin wirkt als Vasokonstriktor, da es eine sehr hohe Affinität zu dem Vasodilatator Stickstoffmonoxid (NO) aufweist und somit dessen Konzentration senkt. Unter dieser Versuchsanordnung kam es, als Antwort auf die neuronale Depolarisation, zu einem langandauernden massiven Abfall des rCBF in ischämische Bereiche, der sogenannten *cortical spreading ischaemia* (CSI). Dabei scheint es während der neuronalen Depolarisation zu einer gestörten Kopplung zwischen cerebralem Metabolismus und Blutfluß zu kommen, die zu einer Vasokonstriktion und schließlich zur Ischämie führt.

Dieses Phänomen konnte bislang lediglich bei der Superfusion einer ACSF mit dem NO-Synthaseinhibitor L-NNA in Kombination mit einer erhöhten Kaliumkonzentration beobachtet werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß auch andere Substanzen, die die NO-Konzentration senken, das Auftreten einer CSI provozieren können.

Zum Nachweis eines möglichen cerebralen Parenchymschadens durch die CSI wurden die Gehirne von 11 Versuchstieren histologisch untersucht. Von den 11 histologisch sowie immunhistochemisch gefärbten Hirnpräparaten wiesen 9 Hirne eine ausgeprägte cortikale Zellnekrose sowie Apoptose auf. Die restlichen 2 Präparate stammten von Tieren, bei denen es zu einem wesentlich kürzeren und milderen Abfall des rCBF gekommen war. Offensichtlich war hier das Ausmaß des Blutflußabfalls nicht ausreichend, um einen irreversiblen Zellschaden zu verursachen.

Bei den Kontrolltieren, denen entweder nur die erhöhte Kaliumkonzentration oder Hämoglobin in der ACSF superfundiert wurde, kam es nicht zum Auftreten von CSIs. In der nachfolgenden histologischen sowie immunhistochemischen Untersuchung der Hirnpräparate war lediglich eine Aktivierung der Astrozyten nachweisbar. Anzeichen von nekrotischem oder apoptotischem Zelluntergang waren nicht zu sehen.

Ein klinischer Zusammenhang der nachgewiesenen cortikalen Infarkte nach CSI könnte sowohl mit dem *delayed ischaemic neurological deficit* (DIND) nach Subarachnoidalblutung als auch mit Migräne-induzierten Infarkten bestehen. Die Rolle des Hämoglobins bei der Entstehung des DIND ist seit langer Zeit Mittelpunkt klinischer und experimenteller Untersuchungen. Bislang wurde die vasospastische Wirkung des Hämoglobins in bezug auf das DIND nicht in Kombination mit einer erhöhten subarachnoidalen Kaliumkonzentration untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Tierversuch, daß diese Kombination die Wirkung um ein Vielfaches verstärkt, und könnten zu einem besseren Verständnis der Entstehung des DIND beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Astrup J and Norberg K. 1976. Potassium activity in cerebral cortex in rats during progressive severe hypoglycemia. *Brain Res* 103:418-423.

Avoli M, Drapeau C, Louvel J, Pumain R, Olivier A, and Villemure JG. 1991. Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann Neurol* 30:589-596.

Back T, Nedergaard M, and Ginsberg M. 1998. The ischemic penumbra: pathophysiology and relevance of spreading depression-like phenomena. In: Ginsberg MD and Bogousslavsky J, editors. *Cerebrovascular disease - pathology, diagnosis and treatment*. Cambridge, MA: Blackwell Scientific Publications. p 276-286.

Bailey P and von Bonin G. 1951. The isocortex of man. In: Urbana: University of Illinois Press.

Basarsky TA, Duffy SN, Andrew RD, and MacVicar BA. 1998. Imaging spreading depression and associated intracellular calcium waves in brain slices. *J Neurosci* 18:7189-7199.

Bogousslavsky J, Regli F, Van Melle G, Payot M, and Uske A. 1988. Migraine stroke. *Neurology* 38:223-227.

Branston NM, Strong AJ, and Symon L. 1977. Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow. Relationships during progressive ischaemia in baboon cerebral cortex. *J Neurol Sci* 32:305-321.

Bredesen DE. 1995. Neural apoptosis. *Ann Neurol* 38:839-851.

Broderick JP and Swanson JW. 1987. Migraine-related strokes. Clinical profile and prognosis in 20 patients. *Arch Neurol* 44:868-871.

Bures J, Buresova O, and Krivanek J. 1974. The mechanism and applications of Leão's spreading depression. Academia, Prague.

Buring JE, Hebert P, Romero J, Kittross A, Cook N, Manson J, Peto R, and Hennekens C. 1995. Migraine and subsequent risk of stroke in the Physicians' Health Study. *Arch Neurol* 52:129-134.

Carolei A, Marini C, and De Matteis G. 1996. History of migraine and risk of cerebral ischaemia in young adults. The Italian National Research Council Study Group on Stroke in the Young. *Lancet* 347:1503-1506.

Colonna DM, Meng W, Deal DD, and Busija DW. 1994. Nitric oxide promotes arteriolar dilation during cortical spreading depression in rabbits. *Stroke* 25:2463-2470.

Dickie BG, Lewis MJ, and Davies JA. 1990. Potassium-stimulated release of nitric oxide from cerebellar slices. *Br J Pharmacol* 101:8-9.

Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, and Pulsinelli W. 1989. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:589-596.

Dirnagl U and Meisel A. 1999. Zerebrale Ischämie. In: Ganten D and Ruckpaul K, editors. *Handbuch der molekularen Medizin, Band 5*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p 510-541.

Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhüpl KM, Victorov I, and Dirnagl U. 2000. Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic

neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? J Neurosurg 93:658-666.

Dreier JP, Körner K, Ebert N, Gorner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhupl KM, Lauritzen M, and Dirnagl U. 1998. Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K⁺ is increased in the subarachnoid space. J Cereb Blood Flow Metab 18:978-990.

Duckrow RB. 1991. Regional cerebral blood flow during spreading cortical depression in conscious rats. J Cereb Blood Flow Metab 11:150-154.

Duckrow RB. 1993. A brief hypoperfusion precedes spreading depression if nitric oxide synthesis is inhibited. Brain Res 618:190-195.

Edwards DH, Byrne JV, and Griffith TM. 1992. The effect of chronic subarachnoid hemorrhage on basal endothelium-derived relaxing factor activity in intrathecal cerebral arteries. J Neurosurg 76:830-837.

Fabricsius M and Lauritzen M. 1994. Examination of the role of nitric oxide for the hypercapnic rise of cerebral blood flow in rats. Am J Physiol 266:H1457-H1464.

Feigin VL, Rinkel GJ, Algra A, Vermeulen M, and van Gijn J. 1998. Calcium antagonists in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. Neurology 50:876-883.

F  r   C. 1881. Contribution    l'étude de la migraine ophthalmique. Rev Med Paris 1:625-649.

Findlay JM, Kassell NF, Weir BK, Haley EC, Jr., Kongable G, Germanson T, Truskowski L, Alves WM, Holness RO, and Knuckey NW. 1995. A randomized trial of intraoperative, intracisternal tissue plasminogen activator for the prevention of vasospasm. Neurosurgery 37:168-176.

Fisher CM, Kistler JP, and Davis JM. 1980. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid

hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 6:1-9.

Furchgott RF and Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.

Garcia JH, Liu KF, and Ho KL. 1995. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke* 26:636-642.

Gjedde A, Hansen AJ, and Quistorff B. 1981. Blood-brain glucose transfer in spreading depression. *J Neurochem* 37:807-812.

Goadsby PJ, Kaube H, and Hoskin KL. 1992. Nitric oxide synthesis couples cerebral blood flow and metabolism. *Brain Res* 595:167-170.

Gorelova NA, Koroleva VI, Amemori T, Pavlik V, and Bures J. 1987. Ketamine blockade of cortical spreading depression in rats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 66:440-447.

Grafstein B. 1963. Neuronal release of potassium during spreading depression. In: Brazier M.A.B., editor. *Brain function, Vol. 1, Cortical excitability and steady potentials*. Berkley: University press of Californ Press. p 87-124.

Hajek I, Subbarao KV, and Hertz L. 1996. Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na⁺, K⁺-ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes. *Neurochem Int* 28:335-342.

Haley EC, Kassell NF, Alves WM, Weir BK, and Hansen CA. 1995. Phase II trial of tirilazad in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A report of the Cooperative Aneurysm Study. *J Neurosurg* 82:786-790.

Haley EC, Kassell NF, Apperson-Hansen C, Maile MH, and Alves WM. 1997. A randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of tirilazad mesylate in patients with aneurysmal

subarachnoid hemorrhage: a cooperative study in North America. *J Neurosurg* 86:467-474.

Hansen AJ and Lauritzen M. 1984. The role of spreading depression in acute brain disorders. *An Acad Bras Cienc* 56:457-479.

Hansen AJ, Quistorff B, and Gjedde A. 1980. Relationship between local changes in cortical blood flow and extracellular K⁺ during spreading depression. *Acta Physiol Scand* 109:1-6.

Hossmann KA. 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265-9269.

Irikura K, Maynard KI, and Moskowitz MA. 1994. Importance of nitric oxide synthase inhibition to the attenuated vascular responses induced by topical L-nitroarginine during vibrissal stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:45-48.

Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, and Stamler JS. 1996. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380:221-226.

Kaoutzanis M, Yokota M, Sibilia R, and Peterson JW. 1993. Neurologic evaluation in a canine model of single and double subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci Methods* 50:301-307.

Kassell NF, Torner JC, Haley EC, Jr., Jane JA, Adams HP, and Kongable GL. 1990. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurg* 73:18-36.

Kraig RP and Nicholson C. 1978. Extracellular ionic variations during spreading depression.

Neuroscience 3:1045-1059.

Kunkler PE and Kraig RP. 1998. Calcium waves precede electrophysiological changes of spreading depression in hippocampal organ cultures. *J Neurosci* 18:3416-3425.

Kuschinsky W, Wahl M, Bosse O, and Thurau K. 1972. Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. A microapplication study. *Circ Res* 31:240-247.

Lashley K. 1941. Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine. *Arch Neurol Psychiatry* 46:331-339.

Launer LJ, Terwindt GM, and Ferrari MD. 1999. The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: the GEM study. *Neurology* 53:537-542.

Lauritzen M. 1984. Long-lasting reduction of cortical blood flow of the brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO₂ response. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:546-554.

Lauritzen M. 1994. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117 (Pt 1):199-210.

Lauritzen M and Hansen AJ. 1992. The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:223-229.

Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, and Nicholson C. 1988. Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res* 475:317-327.

Leão AA. 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7:359-390.

Leão AA and Morison RS. 1945. Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol* 8:33-45.

Lennihan L, Mayer SA, Fink ME, Beckford A, Paik MC, Zhang H, Wu YC, Klebanoff LM, Raps EC, and Solomon RA. 2000. Effect of hypervolemic therapy on cerebral blood flow after subarachnoid hemorrhage : a randomized controlled trial. *Stroke* 31:383-391.

Li Y, Sharov VG, Jiang N, Zaloga C, Sabbah HN, and Chopp M. 1995. Ultrastructural and lightmicroscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 146:1.045-1.051.

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, and Stamler JS. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632.

Macdonald RL. 1997. Cerebral vasospasm. In: Welch KM, Caplan LR, Reis DJ, Siesjö BK, and Weir B, editors. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. Academic Press. p 490-497.

Macdonald RL and Weir BK. 1991. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 22:971-982.

Marshall WH. 1959. Spreading cortical depression of Leão. *Physiol Rev* 39:239-279.

Mayevsky A, Doron A, Manor T, Meilin S, Zarchin N, and Ouaknine GE. 1996. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res* 740:268-274.

McCulloch J, Edvinsson L, and Watt P. 1982. Comparison of the effects of potassium and pH on the calibre of cerebral veins and arteries. *Pflugers Arch* 393:95-98.

Megyesi JF, Vollrath B, Cook DA, and Findlay JM. 2000. In vivo animal models of cerebral

vasospasm: a review. *Neurosurgery* 46:448-460.

Menzies SA, Hoff JT, and Betz AL. 1992. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 31:100-106.

Merikangas KR, Fenton BT, Cheng SH, Stolar MJ, and Risch N. 1997. Association between migraine and stroke in a large-scale epidemiological study of the United States. *Arch Neurol* 54:362-368.

Minato H, Hashizume M, Masuda Y, and Hosoki K. 1995. Modulation of extraluminally induced vasoconstrictions by endothelium-derived nitric oxide in the canine basilar artery. *Arzneimittelforschung* 45:675-678.

Moro MA, Russel RJ, Cellek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-USmar VM, Radomski MW, and Moncada S. 1996. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1480-1485.

Moskowitz MA and Macfarlane R. 1993. Neurovascular and molecular mechanisms in migraine headaches. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5:159-177.

Müller M and Somjen GG. 1998. Inhibition of major cationic inward currents prevents spreading depression-like hypoxic depolarization in rat hippocampal tissue slices. *Brain Res* 812:1-13.

Mutch WA and Hansen AJ. 1984. Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:17-27.

Nedergaard M. 1994. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.

Nedergaard M and Astrup J. 1986. Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current

potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:607-615.

Nedergaard M and Hansen AJ. 1988. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 449:395-398.

Neil-Dwyer G, Lang DA, Doshi B, Gerber CJ, and Smith PW. 1994. Delayed cerebral ischaemia: the pathological substrate. *Acta Neurochir (Wien)* 131:137-145.

Nicholson C. 1993. Volume transmission and propagation of spreading depression. In: Lehmkuhler A., Grotemeyer K.-H., and Tegtmeier F, editors. *Migraine: basic mechanisms and treatment*. München: Urban und Schwarzenberg. p 293-308.

Nicholson C and Kraig RP. 1981. The behavior of extracellular ions during spreading depression. In: Zeuthen T, editor. *The application of ion-selective microelectrodes*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Pr.

Nilsson OG, Brandt L, Ungerstedt U, and Saveland H. 1999. Bedside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic deterioration. *Neurosurgery* 45:1176-1184.

Nishiye E, Nakao K, Itoh T, and Kuriyama H. 1989. Factors inducing endothelium-dependent relaxation in the guinea-pig basilar artery as estimated from the actions of haemoglobin. *Br J Pharmacol* 96:645-655.

Ohta O, Kajikawa H, and Yoshikawa Y. 1980. Cerebral vasospasm and hemoglobin: clinical and experimental studies. In: Wilkins RH, editor. *Cerebral arterial spasm. Proceedings of the second international workshop, Amsterdam, the Netherlands 1979*. Baltimore: Williams & Wilkins. p 166-172.

Ohta O, Osaka K, Siguma M, and et al. 1983. Cerebral vasospasm following ruptured intracranial aneurysms, especially some contributions of potassium ion release from subarachnoid hematoma to delayed cerebral vasospasm. In: Bevan JA, editor. *Vascular*

Neuroeffector Mechanisms. New York: Raven Press. p 353-358.

Oka H, Kako M, Matsushima M, and Ando K. 1977. Traumatic spreading depression syndrome. Review of a particular type of head injury in 37 patients. *Brain* 100:287-298.

Palmer RM, Ferrige AG, and Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.

Paulson OB and Newman EA. 1987. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237:896-898.

Pelligrino DA, Gay RL, III, Baughman VL, and Wang Q. 1996. NO synthase inhibition modulates NMDA-induced changes in cerebral blood flow and EEG activity. *Am J Physiol* 271:H990-H995.

Perutz MF. 1996. Blood. Taking the pressure off. *Nature* 380:205-206.

Pluta RM, Afshar JK, Boock RJ, and Oldfield EH. 1998. Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 88:557-561.

Priller J, Haas CA, Reddington M, and Kreutzberg GW. 1995. Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells. *Glia* 15:447-457.

Proust F, Hannequin D, Langlois O, Freger P, and Creissard P. 1995. Causes of morbidity and mortality after ruptured aneurysm surgery in a series of 230 patients. The importance of control angiography. *Stroke* 26:1553-1557.

Rapoport RM and Murad F. 1983. Effect of ouabain and alterations in potassium concentration on relaxation induced by sodium nitroprusside. *Blood Vessels* 20:255-264.

Rapoport RM, Schwartz K, and Murad F. 1985. Effect of sodium-potassium pump inhibitors and membrane-depolarizing agents on sodium nitroprusside-induced relaxation and cyclic guanosine monophosphate accumulation in rat aorta. *Circ Res* 57:164-170.

Read SJ and Parsons AA. 2000. Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan? *Brain Res* 870:44-53.

Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, and Nelson MT. 1993. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265:C299-C303.

Russell MB, Rasmussen BK, Thorvaldsen P, and Olesen J. 1995. Prevalence and sex-ratio of the subtypes of migraine. *Int J Epidemiol* 24:612-618.

Sarrafzadeh AS, Unterberg AW, and Lanksch WR. 1998. Bedside-microdialysis for early detection of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Case report and review of the literature. *Zentralbl Neurochir* 59:269-273.

Scheller D, Heister U, Dengler K, and Tegtmeier F. 1991. Extracellular changes of aspartate and glutamate during generation and propagation of cortical spreading depression in rats. In: Olesen J, editor. *Cerebral blood flow in migraine, tension-type headache and cluster headache*. New York: Raven Press.

Somjen GG, Aitken PG, Czeh GL, Herreras O, Jing J, and Young JN. 1992. Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S248-S254.

Spielmeyer W. 1925. Zur Pathogenese der örtlich elektiven Gehirnveränderungen. *Z Neurol Psychiatry* 99:756-777.

Sramka M, Brozek G, Bures J, and Nadvornik P. 1977. Functional ablation by spreading

depression: possible use in human stereotactic neurosurgery. *Appl Neurophysiol* 40:48-61.

Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, and Piantadosi CA. 1997. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276:2034-2037.

Stoltenburg-Didinger G and Schwarz K. 1987. Brain lesions secondary to subarachnoid hemorrhage due to ruptured aneurysms. In: Cervós-Navarro J and Ferszt R, editors. *Stroke and Microcirculation*. New York: Raven Press. p 471-480.

Strong AJ, Venables GS, and Gibson G. 1983. The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 1. Topography of changes in blood flow, potassium ion activity, and EEG. *J Cereb Blood Flow Metab* 3:86-96.

Tzourio C, Tehindrazanarivelo A, Iglesias S, Alperovitch A, Chedru F, d'Anglejan-Chatillon J, and Boussier MG. 1995. Case-control study of migraine and risk of ischaemic stroke in young women. *BMJ* 310:830-833.

Victorov IV, Prass K, and Dirnagl U. 2000. Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain Res Brain Res Protoc* 5:135-139.

Villringer A and Dirnagl U. 1995. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7:240-276.

Wahl M, Lauritzen M, and Schilling L. 1987. Change of cerebrovascular reactivity after cortical spreading depression in cats and rats. *Brain Res* 411:72-80.

Wang Q, Paulson OB, and Lassen NA. 1992. Effect of nitric oxide blockade by NG-nitro-L-arginine on cerebral blood flow response to changes in carbon dioxide tension. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:947-953.

Wijdicks EF, Vermeulen M, Hijdra A, and van Gijn J. 1985. Hyponatremia and cerebral

infarction in patients with ruptured intracranial aneurysms: is fluid restriction harmful? *Ann Neurol* 17:137-140.

Wolf T, Lindauer U, Obrig H, Dreier J, Back T, Villringer A, and Dirnagl U. 1996. Systemic nitric oxide synthase inhibition does not affect brain oxygenation during cortical spreading depression in rats: a noninvasive near-infrared spectroscopy and laser-Doppler flowmetry study. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1100-1107.

Zabramski JM. 1997. Vasospasm after subarachnoid hemorrhage. In: Bederson JB, editor. *Subarachnoid hemorrhage: pathophysiology and management*, Neurosurgical Topics. The American Association of Neurological Surgeons. p 127-156.

Zhang ZG, Chopp M, Maynard KI, and Moskowitz MA. 1994. Cerebral blood flow changes during cortical spreading depression are not altered by inhibition of nitric oxide synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:939-943.

6.1 Publikationen

Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, Reuter U, Imai Y, Einhüpl KM, Victorov I, and Dirnagl U. 2000. Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg* 93:658-666.

Dreier JP, Körner K, Ebert N, Gerner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhüpl KM, Lauritzen M, and Dirnagl U. 1998. Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K^+ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:978-990.

Dreier JP, Ebert N, Reuter U, Wolf T, Leistner S, Villringer A and Dirnagl U. 1997. Pharmacological transformation of spreading depression (SD) related hyperperfusion to an acute and longlasting hypoperfusion by NOS-inhibition and ouabain. *Society for Neuroscience Abstracts* 23, 1309.

7 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Dirnagl, für die Überlassung des Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung. Er hat mich mit seiner einzigartigen Zuverlässigkeit fachlich und persönlich stets unterstützt und motiviert. Ich habe in ihm einen wichtigen Mentor gewonnen.

Von Herzen danke ich auch meinem Betreuer Dr. Jens Dreier, der meine Dissertation von Anfang an begleitet hat, mir jederzeit geduldig zur Verfügung stand und mich durch seine Leidenschaft am Forschen immer wieder sehr bestärkt hat. Ich habe viel von ihm gelernt.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der histologischen Färbungen danke ich Prof. Dr. Ilya Victorov in besonderem Maße.

Dr. Josef Priller danke ich für seine Hilfestellung und Offenheit für Fragen bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Für seine Geduld und seine Ideen sowie den biochemischen Beistand im Zusammenhang mit der Hämoglobininbearbeitung, danke ich Dr. Dirk Megow.

Robert Paul danke ich für die ermutigenden und kritischen Gespräche, die meine Entscheidungen und mein Durchhaltevermögen sehr bestärkt haben.

Für das interessierte und zeitaufwendige Durchlesen, die inhaltlichen Anregungen und Anmerkungen zur deutschen Rechtschreibung möchte ich Helmut Krähe, meinem Vater und Alexander Weidemann von ganzem Herzen danken.

Herzlichst möchte ich mich auch bei Florian Stockhammer bedanken, der mir im Umgang mit dem Computer viel beigebracht hat und bei der Erstellung der digitalen Abbildungen eine große Hilfe war.

Rumiana Ebert und Klaus Ebert, meine Eltern, sind die Menschen, ohne deren geistige, begeisternde und praktische Unterstützung weder mein Studium noch meine Dissertation möglich gewesen wäre; ihnen gebührt mein letzter und innigster Dank.

8 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die Dissertation

***Cortical spreading ischaemia* als Folge von freiem Hämoglobin und erhöhter Kaliumkonzentration im Subarachnoidalraum induziert cortikale Infarkte bei der Ratte**

von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, daß sie auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und daß die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 12. Dezember 2000

Natalie Ebert